



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO CON *Rhizopus oryzae* Y  
EVALUACIÓN DE SU EFECTO SOBRE LAS  
CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y FUNCIONALES DE  
MAÍZ PIGMENTADO**

---

Por:

**Ulises Ramírez Esparza**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS Y  
LÁCTEOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

## **APROBACIÓN**

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ulises Ramírez Esparza la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



---

**Dr. José Juan Buenrostro Figueroa**  
Director de tesis



---

**Dr. Juan Alberto Ascacio Valdés**  
Co-Director de tesis



---

**Dr. Ramiro Baeza Jiménez**  
Integrante del comité de tesis



---

**Dra. Sandra Mónica Alvarado González**  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Fermentación en Medio sólido con *Rhizopus oryzae* y Evaluación de su Efecto sobre las Características Nutrimientales y Funcionales de Maíz Pigmentado" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Ulises Ramírez Esparza, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos

Dra. Gracielea Caire Juvera  
Directora General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías, (CONAHCYT) por el apoyo económico en el Programa Nacional de Posgrados con la clave CVU No. 1151315.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A. C.) Unidad Delicias, por brindarme la oportunidad de cursar mis estudios de posgrado, por facilitar el uso de las instalaciones para el mismo y por el apoyo de los investigadores para formarme como estudiante.

A mi director de tesis, el Dr. José Juan Buenrostro Figueroa por ser pilar en esta investigación, aportar los fundamentos y por servir de inspiración para continuar con mis estudios de posgrado.

A mi Co-director de tesis, el Dr. Juan Alberto Ascacio Valdés, por involucrarse en la investigación, por estar al pendiente y por las horas invertidas en la capacitación y apoyo durante la estancia en Saltillo.

A mi comité de tesis integrado por la Dra. Sandra Mónica Alvarado González, Dr. Ramiro Baeza Jiménez y al M.C. Emilio Ochoa Reyes, por estar al pendiente de mi formación y por brindarme la ayuda necesaria.

A cada uno de los docentes que formaron parte de mi formación durante mi estancia en el posgrado y por compartir sus conocimientos específicos para enriquecer mi investigación.

A mis Padres por el apoyo incondicional otorgado a lo largo de mis estudios de posgrado y sobre todo por impulsarme en alcanzar mis sueños.

A mis hermanos por estar siempre apoyándome a lo largo de los días y por su valiosa compañía.

Y por último, al Creador de todas las cosas, por permitirme llegar a este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos.

## DEDICATORIA

*Con todo mi corazón para mi abuelita Adela. Tu bendición a diario a lo largo de mi vida me protege y me lleva por el camino del bien. Por eso te doy mi trabajo en ofrenda por tu paciencia y amor.*

*Para mi Padrino Ángel Esparza Chávez, mi primer maestro, mi guía, mi mentor en la vida, mi modelo a seguir y sobre todo mi amigo, tus valores y enseñanzas viven con nosotros y te hacen inmortal.*

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	5
<b>CONTENIDO</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	9
<b>RESUMEN</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	13
2.1. Alimentos Funcionales .....	13
2.2. Maíz.....	13
2.3. Compuestos Fenólicos.....	16
2.4. Capacidad Antioxidante .....	18
2.5. Fermentación en Medio Sólido.....	20
2.5.1. Parámetros de Proceso en la FMS .....	21
2.5.1.1. Sustrato .....	21
2.5.1.2. Contenido de humedad.....	22
2.5.1.3. Temperatura .....	22
2.5.1.4. pH.....	22
2.5.1.5. Tamaño de inóculo .....	23
2.6. <i>Rhizopus Oryzae</i> .....	23
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	25
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	26
4.1. Objetivo General.....	26
4.2. Objetivos Específicos .....	26
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	27
5.1. Material Vegetal.....	27
5.2. Microorganismo .....	27
5.3. ETAPA 1. Caracterización Fisicoquímica y Selección de Tiempo de Fermentación.....	27
5.3.1. Caracterización Fisicoquímica .....	27
5.3.2. Fermentación en Medio Sólido .....	28
5.4. ETAPA 2. Efecto de las Condiciones de Proceso de FMS Sobre la Liberación de Contenido de Fenoles Totales con Capacidad Antioxidante.....	29

## CONTENIDO (continuación)

5.5. ETAPA 3. Evaluación del Efecto de la FMS a un Volumen Mayor Sobre la Composición Fisicoquímica Bajo Condiciones de Mayor Liberación de Fenoles con Capacidad Antioxidante.....	30
5.6. Métodos Analíticos .....	31
5.6.1. Caracterización Fisicoquímica .....	31
5.6.2. Determinación de Contenido de Fenoles Hidrolizables.....	31
5.6.3. Determinación de Contenido de Fenoles Condensados.....	32
5.6.4. Determinación de Contenido de Fenoles Totales.....	32
5.6.5. Determinación de Capacidad Antioxidante por DPPH.....	32
5.6.6. Determinación de Capacidad Antioxidante por ABTS.....	33
5.6.7. Determinación de Capacidad Antioxidante por FRAP.....	33
5.6.8. Análisis Respirométrico.....	33
5.7. Análisis Estadístico .....	34
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>35</b>
6.1. ETAPA 1. Caracterización Fisicoquímica y Selección de Tiempo de Fermentación.....	35
6.2. ETAPA 2. Exploración de Condiciones de Proceso. ....	42
6.3. ETAPA 3. Evaluación del Efecto de la FMS en el Maíz Pigmentado a Mayor Volumen Bajo las Mejores Condiciones. ....	46
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>50</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>9. REFERENCIAS .....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Partes del grano de maíz.....	16
2	Clasificación de compuestos fenólicos, estructura base, ejemplos y mecanismo de acción. ....	18
3	Consumo de O <sub>2</sub> y producción de CO <sub>2</sub> por <i>R. oryzae</i> usando como sustrato maíz pigmentado en reactores de charola.....	40
4	Consumo de O <sub>2</sub> y producción de CO <sub>2</sub> . Las líneas de círculos representan los datos experimentales y las líneas solidas los datos ajustados al modelo logístico. ....	41
5	Efecto del tiempo de FMS con <i>R. oryzae</i> sobre el CFT libres (-o-) y CFT ligados (-o-) de maíz pigmentado.....	44
6	Efecto del tiempo de FMS sobre la capacidad antioxidante DPPH (-o-), ABTS (-o-) y FRAP (-o-) de maíz pigmentado.....	45
7	Diagrama de Pareto para CFT libres.....	47
8	Crecimiento de <i>R. oryzae</i> sobre maíz pigmentado, control sin fermentar (izq) y fermentado a las 60 h con tratamiento 6 (der).....	51

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Estudios de FMS para incrementar el contenido fenólico (CF) y la capacidad antioxidante (CA) en matrices vegetales. ....	22
2	Matriz experimental $2^k$ Box-Hunter & Hunter para evaluar el efecto de la temperatura, concentración de inóculo, pH y concentración de sales ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) sobre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante de maíz pigmentado.....	32
3	Composición fisicoquímica del maíz pigmentado (g/100g).....	38
4	Parámetros cinéticos estimados mediante el modelo logístico.....	42
5	Contenido de fenoles hidrolizables y condensados de la fracción libre durante la fermentación de maíz pigmentado.....	42
6	Coefficientes de correlación de Pearson que indican la asociación entre variables de respuesta.....	46
7	Efecto de las condiciones del proceso sobre el contenido fenólico y capacidad antioxidante del maíz pigmentado.....	48
8	Matriz BHH utilizada para evaluar el efecto 6 factores (A, B, C, D, E Y F) sobre CFT libre de maíz pigmentado con <i>R. oryzae</i> en FMS.....	49
9	Efecto de FMS sobre la composición fisicoquímica a (g/100g), CFT libre (mg/gms) y CA del maíz pigmentado.....	53

## RESUMEN

El maíz es uno de los cereales más cultivados del mundo y contiene un gran número de compuestos antioxidantes, como los compuestos fenólicos. No obstante, parte de ellos están unidos a componentes de la pared celular del maíz, y se requieren pretratamientos para liberarlos. La fermentación en medio sólido (FMS) con *Rhizopus oryzae* se ha empleado para aumentar la capacidad antioxidante en granos y legumbres. Sin embargo, no existe evidencia de su uso en maíces pigmentados. El objetivo del presente estudio fue evaluar el crecimiento de *R. oryzae* en FMS empleando como soporte maíz pigmentado y su efecto en la liberación de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante. Asimismo, se evaluó el efecto de diversos factores (temperatura, pH, inóculo y sales del medio) sobre la liberación de compuestos fenólicos (libres y ligados) y la capacidad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP), así como el efecto de la FMS sobre el contenido nutrimental del maíz. Los resultados obtenidos demostraron que *R. oryzae* tuvo la capacidad de crecer empleando como soporte el grano de maíz pigmentado, y liberar los compuestos fenólicos, alcanzando su valor más alto a las 60 h de cultivo. El uso de FMS permitió aumentar hasta 161 y 94 % el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante del maíz, respectivamente, con respecto al control sin fermentar. De todos los factores evaluados, el pH afectó de manera negativa sobre la liberación de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante. Finalmente, el proceso de FMS de maíz pigmentado con *R. oryzae* incrementó el contenido de proteína en un 10%, reduciendo el contenido de carbohidratos y fibra un 3% y 8%, respectivamente. La FMS representa una alternativa sustentable para incrementar las características funcionales del grano de maíz.

**Palabras clave:** *Zea mays*, capacidad antioxidante, contenido fenólico.

## ABSTRACT

The maize is one of the most widely grown cereals in the world and contains a large number of antioxidant compounds, such as phenolic compounds. However, some of them are bound to components of the maize cell wall, and pretreatments are required to release them. Solid-state fermentation (SSF) with *Rhizopus oryzae* has been used to increase the antioxidant capacity of grains and legumes. However, there is no evidence of its use in pigmented maize. The objective of the present study was to evaluate the growth of *R. oryzae* in SSF using pigmented maize as a support and its effect on the release of phenolic compounds with antioxidant capacity. The effect of different factors (temperature, pH, inoculum and salts in the medium) on the release of phenolic compounds (free and bound) and antioxidant capacity (DPPH, ABTS and FRAP) was also evaluated, as well as the effect of SSF on the nutrient content of maize. The results obtained showed that *R. oryzae* had the ability to grow using pigmented maize grain as a support, and to release phenolic compounds, reaching its highest value at 60 h of cultivation. The use of SSF increased the total phenolic content and the antioxidant capacity of maize up to 161 and 94 %, respectively, with respect to the unfermented control. From all evaluated factors, pH had a negative effect on the release of phenolic compounds and antioxidant capacity. Finally, the SSF process of maize pigmented with *R. oryzae* increased protein content by 10%, reducing carbohydrate and fiber content by 3% and 8%, respectively. SSF represents a sustainable alternative to increase the functional characteristics of maize grain.

**Key words:** *Zea mays*, antioxidant capacity, phenolic content.

## 1. INTRODUCCIÓN

El maíz ha sido la base de la alimentación desde los pueblos prehispánicos (Cuevas Mejía, 2014). Dentro de las 220 variedades de maíz que se han descrito en América latina (Sierra-Macías *et al.*, 2014) se encuentran los maíces pigmentados, que contienen una alta cantidad de compuestos antioxidantes (Bello-Pérez *et al.*, 2016). Estos compuestos contribuyen en la prevención y tratamiento de enfermedades como el cáncer y la diabetes (Gul *et al.*, 2016). Sin embargo, muchos de estos compuestos no están de forma libre, si no ligados a componentes de la pared celular de las plantas (Streimikyte *et al.*, 2022). Debido a ello, se requieren tratamientos que permitan liberar estos compuestos, como puede ser el uso de enzimas o procesos de fermentación. Durante el proceso de fermentación se presentan cambios en los niveles de compuestos fenólicos, debido a la acción de las enzimas (celulasas, hemicelulasas, xylanasas, pectinasas, proteasas, etc.) producidas en la fase de crecimiento de los microorganismos (Huynh *et al.*, 2014). Estas enzimas pueden romper los componentes químicos de la pared celular, resultando en una hidrólisis de los enlaces que unen a los compuestos fenólicos a la pared celular (Alves Magro y de Castro, 2020), pudiendo así liberar los compuestos antioxidantes. Por lo tanto, se pretende desarrollar una fermentación que permita obtener una materia prima bioprocesada a partir de maíz pigmentado con mejoras en su contenido nutrimental y funcional.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Alimentos Funcionales

En la actualidad, existe una gran tendencia por una alimentación saludable, por lo cual los consumidores cada vez demandan más y mejores alimentos que les aporten además de una nutrición básica algo más al consumirlos.

Estos alimentos que aportan beneficios a la salud más allá de una nutrición básica, se les conocen como alimentos funcionales. Para que un alimento se considere funcional, aparte de aportar nutrientes y beneficios para la salud, debe presentar evidencia científica de como ayudan al organismo (Cámpora, 2016). Martirosyan *et al.* (2021) lo definen de manera completa como “alimentos naturales o procesados que contienen compuestos biológicamente activos; que, en cantidades definidas, eficaces y no tóxicas, proporcionan un beneficio para la salud clínicamente probado y documentado utilizando biomarcadores específicos, para promover una salud óptima y reducir el riesgo de enfermedades crónicas/virales y gestionar sus síntomas”.

Para obtener estas características que hacen de los alimentos funcionales tan interesantes para el consumidor, se debe de adicionar o aumentar el contenido de compuestos bioactivos como lo son: prebióticos, compuestos fenólicos, carotenoides, ácidos grasos, vitaminas y fitoestrógenos (Arias Lamos *et al.*, 2018). Las propiedades benéficas de estos alimentos en la salud del ser humano son variadas, ayudan a prevenir o tratar el cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, así como también a retrasar el proceso de envejecimiento (Gul *et al.*, 2016).

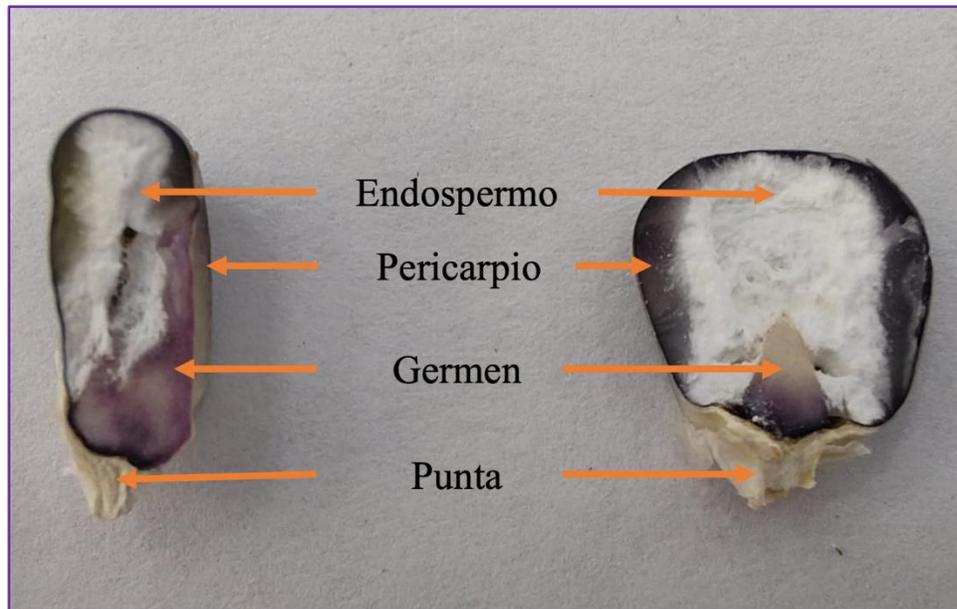
### 2.2. Maíz

El maíz, *Zea mays* L., es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen. Pertenece a la familia de las Poáceas (Gramíneas), tribu Maydeas, y es la única especie cultivada de este género (Paliwal, 2001b). Además, ha sido la base de la alimentación desde los pueblos prehispánicos

(Cuevas Mejía, 2014). Las evidencias del maíz como alimento datan de algunos lugares arqueológicos en nuestro país, las cuales son pequeñas mazorcas de este cereal, que se estima proceden de hace 5000 años de antigüedad (Wilkes, 1985). El maíz, además de poseer un fuerte contenido sociocultural, es el alimento básico en nuestro país, de forma tradicional se consume como tortilla (Trigo y Montenegro, 2002). La gastronomía mexicana que usa como base el maíz es variada, se encuentran alimentos como tamales, elotes, pinoles, atoles, bebidas, entre otros. Sin embargo, el alimento por excelencia elaborado a partir del maíz es “la tortilla”. (Fernández Suárez *et al.*, 2013).

En América Latina se han descrito 220 variedades de maíz (Sierra-Macías *et al.*, 2014), de las cuales los maíces blanco y amarillo son los más usados para la elaboración de productos nixtamalizados. En otras regiones, sobre todo del centro de México, se usan variedades pigmentadas con colores rojo, azul, morado y negro, los cuales se deben a los compuestos antioxidantes presentes como las antocianinas, que se encuentran principalmente, en el pericarpio y la capa de aleurona (Bello-Pérez *et al.*, 2016).

Los granos de maíz están constituidos por tres partes: la cascarilla, el endospermo y el germen (Fig. 1). La cascarilla o pericarpio es la piel externa o cubierta del grano y ocupa el 5% del peso. El endospermo es la reserva energética del grano y ocupa hasta el 83% de su peso, se compone de 90% de almidón, 9% de proteína, y pequeñas cantidades de aceites, minerales y otros elementos. El germen contiene grandes cantidades de energía en forma de aceite, que tiene la función de nutrir a la planta cuando comienza el período de crecimiento, así como otras muchas sustancias necesarias durante el proceso de germinación y desarrollo de la planta (Cuevas Mejía, 2014; Gwartz y Garcia-Casal, 2014).



**Figura 1.** Partes del grano de maíz.

Este cereal presenta diversidad de colores (de blanco a amarillo, rojo, azul, púrpura) y además de ser una fuente de macro y micronutrientes, también contiene fitoquímicos como los carotenoides, antocianinas, flavonoides, fitoesteroles y algunos derivados de ácido hidroxicinámico (González-Muñoz *et al.*, 2013; Rouf Shah *et al.*, 2016). Estos compuestos fenólicos son comúnmente sintetizados por las plantas y son responsables de los colores que van del rojo a púrpura, en la mayoría de los frutos y vegetales, lo cual es benéfico para esas especies que los sintetizan (Flores *et al.*, 2016; Ongkowijoyo *et al.*, 2018). En el grano de maíz, las antocianinas se encuentran en la aleurona o en el pericarpio. Se ha reportado mayor variedad de antocianinas en la aleurona, pero en menor concentración comparado al pericarpio (Paulsmeyer *et al.*, 2017). La diferencia entre maíces pigmentados que van del rojo a púrpura, en comparación con maíces convencionales como el amarillo y el blanco, es la presencia de antocianinas que los hace destacar como alimentos protectores de la salud (Lao *et al.*, 2017).

En México los maíces pigmentados se usan principalmente para elaborar tortillas para autoconsumo, pero también se ocupan en pequeña escala en establecimientos comerciales de comida típica. Sin embargo, de la producción de maíz en México, los maíces pigmentados representan solo el 10 % del total producido en comparación del 90 % que equivale a la producción de maíz blanco o amarillo, los cuales se utilizan para consumo humano o forraje, este bajo

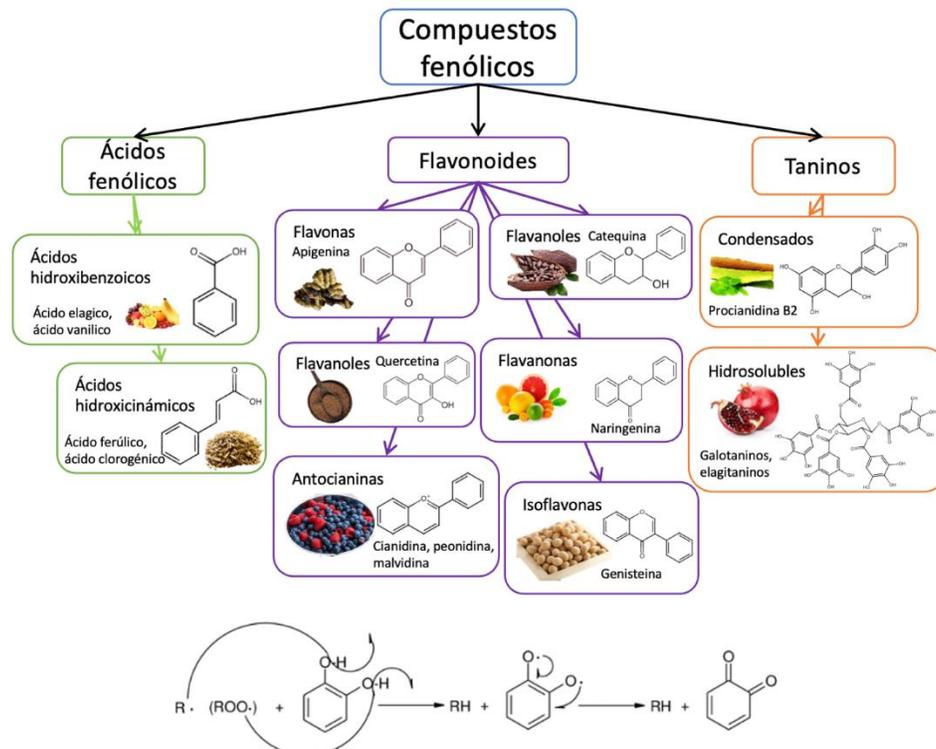
porcentaje de producción indica un aprovechamiento bajo, pues su contenido nutricional y propiedades nutraceuticas representa una gran oportunidad para el desarrollo de nuevos productos, con nuevas o mejores características funcionales y nutricionales (Bello-Pérez *et al.*, 2016).

### 2.3. Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos son componentes nutricionales que se encuentran naturalmente en pequeñas cantidades en diversos productos vegetales o alimenticios. Muchos de estos compuestos bioactivos incluyen metabolitos como antibióticos, micotoxinas, alcaloides, pigmentos y compuestos fenólicos, estos últimos son considerados importantes antioxidantes en la dieta (Martins *et al.*, 2011).

Algunos de los compuestos con estas capacidades antioxidantes son los compuestos fenólicos, los cuales son metabolitos secundarios presentes en las plantas que se derivan de precursores biosintéticos como el piruvato, acetato, algunos aminoácidos y acetyl CoA; y son sintetizados principalmente por las vías del ácido shikimico, la vía de las pentosas fosfato y las vías de metabolismo de fenilpropanoide (Adebo y Gabriela Medina-Meza, 2020; Singh *et al.*, 2017).

Los compuestos fenólicos se dividen en tres subgrupos: los flavonoides, taninos y ácidos fenólicos. Los flavonoides son compuestos que poseen en común un esqueleto 2-fenilcromano (C6-C3-C6), presentes en las plantas, responsable del color en las flores, frutos y semillas (Peñarrieta *et al.*, 2014). Los taninos, por otro lado, son compuestos fenólicos de alto peso molecular (500-3000 g/mol), que ayudan a la pigmentación de la cubierta de las semillas (pericarpio) de los cereales (Adebo y Gabriela Medina-Meza, 2020). Se encuentran presentes en hojas, frutos y cortezas (Peñarrieta *et al.*, 2014). Por último, están los ácidos fenólicos que constituyen también una clase importante de compuestos fenólicos con diferentes funciones bioactivas, presentes en productos vegetales y alimenticios (Martins *et al.*, 2011). En la Figura 2 se muestra la clasificación de compuestos fenólicos, algunos ejemplos y a su vez su estructura química base.



**Figura 2.** Clasificación de compuestos fenólicos, estructura base, ejemplos y mecanismo de acción.

En la actualidad se ha incrementado el uso de compuestos con capacidades antioxidantes, ya que aparte de promover una dieta que otorgue mayores beneficios para la salud, ejercen diversas actividades biológicas, pues se han reportado como anti-cancerígenos, tienen propiedades que retardan el envejecimiento, son utilizados también como antibacterianos, antiinflamatorios; brindan propiedades antitrombóticas y antivirales, cumplen una función inmunológica mejorada, ayudan en la regulación de capilares, disminuyen la presión arterial en personas con sobrepeso, así como su ayuda para regular los niveles de lípidos en la sangre (Chen *et al.*, 2021; Huynh *et al.*, 2014; Torres-León *et al.*, 2019).

En los maíces pigmentados se han reportado algunas antocianinas, que incluyen cianidin-3-glucósido (Cy-3-glu), pelargonidin-3-glucósido (Pg-3-glu), peonidin-3-glucósido (Pn-3-glu) (Lao y Giusti, 2017). También se han reportado la presencia de ácidos fenólicos en diferentes maíces pigmentados, incluidos ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico o ácido *p*-hidroxicinámico, ácido cafeico, ácido protocatecuico, ácido cafeico 4-*O*-hexosido, ácido 5-*O*-cafeoilquinico, ácido ferúlico, ácido clorogénico y *p*-ácido hidroxifenil acético (Hernández *et al.*,

2018; Lao y Giusti, 2017). Así como diversos flavonoides, como lo son Apigenina-*O*-hexosido, Luteolina-*O*-rutinosido, Apigenina-*O*-pentosil hexosido (Hernández *et al.*, 2018).

#### 2.4. Capacidad Antioxidante

En las últimas décadas han incrementado los estudios referentes al estrés oxidativo y como prevenirlo o tratarlo. El estrés oxidativo es causado por el aumento en las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, debido a la incapacidad de los antioxidantes presentes en el cuerpo para contrarrestar el daño causado por estas moléculas oxidativas (López-Alarcón y Denicola, 2013). Por ello, surge la necesidad de incluir en la dieta alimentos ricos en compuestos antioxidantes (Oude Griep *et al.*, 2010). El concepto más utilizado de un compuesto antioxidante es “cualquier sustancia que retarde, prevenga o remueva el daño oxidativo de una molécula”. La capacidad antioxidante (CA) de un compuesto se puede definir como el potencial de una sustancia o compuesto capaz de inhibir o dificultar la oxidación de un sustrato hasta en cantidades muy pequeñas (Benítez-Estrada *et al.*, 2020). Su cuantificación es de gran utilidad para diferentes sectores, ya que indica la calidad de un alimento, la cantidad de antioxidantes presentes o bien la biodisponibilidad de estos (Benítez-Estrada *et al.*, 2020; López-Alarcón y Denicola, 2013).

Se ha reportado que la capacidad antioxidante de algunos maíces pigmentados está altamente correlacionada con la presencia de diversos compuestos bioactivos como lo son antocianinas, flavonoides, ácidos fenólicos, polifenoles y carotenoides (Lao y Giusti, 2017). Esta capacidad antioxidante se ha expresado por diferentes métodos como lo son ABTS, DPPH y FRAP. El ensayo de inhibición del radical 2,2-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) se basa en la cuantificación del descoloramiento del radical ABTS<sup>+</sup> por efecto de la reducción a ABTS por acción de los antioxidantes presentes en la muestra (Santos-Sánchez *et al.*, 2019). La determinación de la CA por el método DPPH se basa en la aceptación de un electrón o átomo de hidrógeno por el radical 2,2-difenil-1-picril-hidracil (DPPH), produciendo un vire de color de violeta a amarillo ocasionado por la reducción del radical por acción de los antioxidantes presentes en la muestra (Abril-Ibarra, 2022; Santos-Sánchez *et al.*, 2019). A diferencia del análisis por DPPH y ABTS, que evalúan la capacidad de la muestra para neutralizar radicales libres, el análisis FRAP (poder

antioxidante reductor del hierro) se basa en el principio de que los antioxidantes son sustancias capaces de reducir el ion férrico al ion ferroso, es decir, evalúa la capacidad reductora mediante un mecanismo de transferencia de hidrógeno (Mercado-Mercado *et al.*, 2013) y a su vez simula las condiciones de un sistema biológico ya que los radicales utilizados en ABTS y DPPH son ajenos al organismo, es decir, no tienen significado biológico. Por otra parte, el  $\text{Fe}^{+2}$  que se forma en el ensayo FRAP puede reaccionar con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  produciendo OH, el cual es considerado el radical libre más dañino en sistemas biológicos (Abril-Ibarra, 2022; Benzie y Strain, 1996; Santos-Sánchez *et al.*, 2019). Hernández *et al.* (2018) reportaron una capacidad antioxidante de un maíz rojo por el ensayo de ABTS de 155.14 mg ET 100g<sup>-1</sup>, por DPPH de 65.20 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> y un contenido de fenoles totales (CFT) de 215.17-527.33 mg EAG 100 g<sup>1</sup>, utilizando diferentes tiempos de extracción y diferentes volúmenes de extracción utilizando una metodología de extracción asistida por ultrasonido. Yang y Zhai (2010) reportaron la capacidad antioxidante de un maíz morado por el ensayo de FRAP, obteniendo 16.2 mmol  $\text{FeSO}_4$  por gramo de materia seca. Loarca-Piña *et al.* (2019) evaluaron varios tipos de maíces pigmentados de color rojo y morado y determinaron la capacidad antioxidante de estos mediante el ensayo FRAP, con valores de entre 0.32-0.83 mmol  $\text{FeSO}_4$  y un contenido total de fenoles de 69.43-212.84 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>.

Sin embargo, la recuperación total de estos compuestos mediante el uso de solventes puede ser un poco difícil, ya que una parte de los compuestos fenólicos están unidos a otras moléculas como azúcares, ácidos grasos o aminoácidos (Chen *et al.*, 2021; Dey y Kuhad, 2014a). Debido a esto y a la consideración de los solventes como peligrosos para la salud y el medio ambiente, es que se han explorado otras alternativas, como lo son la extracción asistida por la acción de un microorganismo durante un proceso de fermentación, donde el microorganismo es capaz de sintetizar diversas enzimas que ayudan a la extracción de los compuestos antioxidantes presentes en la matriz vegetal (Huynh *et al.*, 2014; Leite *et al.*, 2019; Martins *et al.*, 2011).

El cambio en la concentración de compuestos fenólicos por el proceso de fermentación se debe principalmente a la acción de diferentes enzimas como celulasas, hemicelulasas, pectinasas, proteasas, etc., las cuales son principalmente producidas durante la fase de crecimiento de los microorganismos (Dey y Kuhad, 2014a; Huynh *et al.*, 2014; Streimikyte *et al.*, 2022). Estas enzimas son capaces de degradar completamente los componentes químicos de la pared celular de los vegetales, lo que resulta en una hidrólisis de los enlaces que unen los compuestos fenólicos a la matriz de la pared celular, liberando así estos compuestos de interés (Alves Magro y de Castro, 2020).

## 2.5. Fermentación en Medio Sólido

La fermentación es una antigua técnica de procesamiento de alimentos que se ha adaptado durante siglos en todo el mundo. Este proceso implica una conversión y/o modificación intencional de un sustrato a través de las actividades metabólicas realizadas por un microorganismo para obtener un producto deseado. Estos productos obtenidos a través de la implementación de un proceso fermentativo suelen llevarse a cabo mediante acciones microbianas, que alteran positivamente la apariencia, el sabor, las funcionalidades, la composición nutricional, el color y la textura (Adebo y Gabriela Medina-Meza, 2020; Marsh *et al.*, 2014).

La fermentación en medio sólido (FMS) se define como un cultivo microbiano que se desarrolla sobre sustratos húmedos en ausencia o con baja cantidad de agua libre (Dulf *et al.*, 2017). Los sustratos deben de contener suficiente humedad para poder permitir que el microorganismo tenga un crecimiento y metabolismo adecuado (Ruiz *et al.*, 2005). La selección de un microorganismo adecuado para el proceso es uno de los criterios más importantes en la FMS. Existen varios factores que afectan directamente el proceso de la FMS, estos varían de un proceso a otro dependiendo de los sustratos utilizados y su composición, el microorganismo utilizado y la escala de trabajo (Dulf *et al.*, 2017). En el cuadro 1 se muestran varios estudios donde se demuestra que la FMS ayuda a aumentar el contenido de compuestos fenólicos y antioxidantes en diferentes matrices vegetales.

**Cuadro 1.** Estudios de FMS para incrementar el contenido fenólico (CF) y la capacidad antioxidante (CA) en matrices vegetales.

Material vegetal	Microorganismo utilizado	Hallazgo (efecto observado)	Referencias
Maíz blanco	<i>Monascus anka</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	El CF aumentó hasta 25 veces en comparación con el maíz sin fermentar.	Chen <i>et al.</i> (2021)
Torta de germen de trigo	<i>Rhizopus oryzae</i> y <i>Rhizopus oligosporus</i>	El material fermentado contenía, en promedio, 42% más péptidos, un 30 % más de CA que en el sustrato crudo.	Starzyńska-Janiszewska <i>et al.</i> (2021)
Granos de trigo, arroz, maíz y avena.	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. awamori</i> , <i>R. oryzae</i> y <i>R. oligosporus</i>	El CF se incrementó hasta 14 veces usando <i>A. oryzae</i> y la CA se incrementó hasta 66 veces	Dey y Kuhad (2014b)

Tempeh (granos de soya)	<i>R. oligosporus</i> , <i>R. oryzae</i> y <i>R. stolonifer</i>	utilizando <i>R. oryzae</i> . Incrementos de 1.5 y 3 veces el CF y la CA, respectivamente, comparado con la soja sin fermentar.	Aoki <i>et al.</i> (2020)
-------------------------------	---	---	------------------------------

### 2.5.1. Parámetros de Proceso en la FMS

Como en todo proceso se debe de llevar una adecuada selección y control de las variables que influyen en el proceso, cuyas condiciones ideales permitan asegurar el éxito del proceso de fermentación.

2.5.1.1. Sustrato. Los sustratos usados en la FMS son generalmente insolubles en agua. En procesos de FMS, el agua se absorbe a través de las partículas del sustrato, y de esta manera puede ser empleada por el microorganismo para su crecimiento y actividades metabólicas. Las bacterias y levaduras crecen en la superficie del sustrato mientras que el micelio de los hongos penetra en las partículas del sustrato (Manpreet *et al.*, 2005).

Los sustratos utilizados en los procesos de FMS provienen de una alta gama de procesos agroindustriales, ejemplo de ellos son los sustratos lignocelulósicos como paja de trigo o maíz, rastrojo de arroz, salvado de trigo, pulpa de remolacha azucarera y madera. Algunos otros sustratos contienen azúcares solubles como lo son el orujo de uva, sorgo dulce, cáscara de piña, cáscara de naranja y pulpa de café (Leite *et al.*, 2019; Lima *et al.*, 2015; Ravichandran y R, 2012).

Los sustratos naturales son abundantes, fáciles de conseguir y además baratos, comparado con los sustratos sintéticos. Sin embargo, los sustratos naturales requieren de un tratamiento previo para que sus componentes sean más accesibles y que su estructura sea más susceptible al ataque y del microorganismo. Por lo general, estos pretratamientos consisten en reducir el tamaño de partícula o agrietar el sustrato para que el interior de la partícula sea más accesible. También puede ser necesario el suministrar nutrientes adicionales para estimular el crecimiento del microorganismo, inducir la síntesis de enzimas o bien para prolongar la producción de metabolitos secundarios (Manpreet *et al.*, 2005).

2.5.1.2. Contenido de humedad. Uno de los factores más importantes en los procesos de FMS es la humedad del sustrato, ya que un nivel adecuado influye en gran medida sobre el crecimiento microbiano y las actividades metabólicas de este. Un contenido de humedad alto puede presentar problemas en la FMS, ya que disminuye la porosidad del lecho y por consiguiente afecta la difusión de oxígeno, y además aumenta el riesgo de contaminación por bacterias anaerobias. Generalmente, el contenido de humedad del sustrato en FMS oscila entre 30 % a 85 % (Chávez-González *et al.*, 2018).

2.5.1.3. Temperatura. La temperatura influye en el crecimiento microbiano, ya que puede afectar la germinación de esporas y el rendimiento del proceso. Por otro lado, puede acelerar las reacciones enzimáticas y químicas en el crecimiento microbiano, si se eleva demasiado puede ocasionar inactivación enzimática interrumpiendo así el crecimiento del microorganismo (Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2017). La temperatura puede variar debido a que el crecimiento de los microorganismos genera calor (Chávez-González *et al.*, 2018).

En procesos de FMS, el aumento de temperatura derivado del calor metabólico es un problema recurrente y difícil de controlar. La transferencia de temperatura se debe a la eliminación ineficiente del calor en el sustrato, ocasionando gradientes de temperatura, deshidratación del medio, variabilidad en la composición del sustrato, entre otras cosas. Por ello, el calor debe de ser disipado inmediatamente haciendo uso de diferentes mecanismos, como lo son enfriamiento por bandejas metálicas con refrigerante en circulación, aireación forzada, circulación por la camisa que rodea el fermentador o agitación de los sólidos (Manpreet *et al.*, 2005).

2.5.1.4. pH. Es un parámetro crítico en FMS, su seguimiento y control durante el transcurso del proceso es algo difícil, comparado con su fácil monitoreo en fermentación líquida (Chávez-González *et al.*, 2018).

Los cambios en el pH durante la fermentación son debido a la producción de ácidos o liberación de amoníaco durante la fermentación, lo que provoca descenso o aumento en los valores, respectivamente (Manpreet *et al.*, 2005). No obstante, en FMS, los microorganismos suelen poseer una relativa estabilidad frente al pH en comparación con los procesos sumergidos, esto debido a la

elevada capacidad tampón de los sustratos usuales, por lo que mediante el ajuste inicial del pH del sustrato es posible eliminar la necesidad de su control durante el proceso. Sin embargo, es recomendable el uso de microorganismos que puedan crecer en una amplia gama de pH y que tenga un amplio pH óptimo (Manpreet *et al.*, 2005).

2.5.1.5. Tamaño de inóculo. El tamaño de inóculo depende tanto de la naturaleza del microorganismo como del medio en el que se desarrolla. Esta cantidad inicial de microorganismo es crucial debido a que, si existe un nivel alto de este parámetro, puede reducir el tiempo de adaptación del microorganismo y un buen crecimiento de la biomasa, sin embargo, si se excede demasiado la cantidad de este parámetro puede desencadenar una serie de desventajas como disminuir la cantidad de nutrientes disponibles para un crecimiento óptimo y por ende la disminución de metabolitos (Chávez-González *et al.*, 2018). Mientras que una baja concentración podría resultar en una biomasa ineficiente y un tiempo de adaptación más prolongado (Jiang *et al.*, 2019; Othman y Sebo, 2023). Dentro de los organismos más utilizados en procesos de FMS se encuentran los hongos filamentosos, destacando los del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus*, ya que por su gran adaptabilidad son los más indicados para este bioproceso (Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2004; Dulf *et al.*, 2015; Venturini Copetti, 2019).

## 2.6. *Rhizopus Oryzae*

*Rhizopus* es un género de hongos pertenecientes a la clase *Fitomicetos*; orden *Mucolares*, familia *Mucoraceae*. Este género comprende 10 especies, algunas dañinas para las plantas como lo es *R. arrhizus*, y otras especies empleadas en la elaboración de alimentos fermentados como lo son *R. oligosporus*, *R. stolonifer* y *R. oryzae* (Aoki *et al.*, 2020; Ibaruri y Hernández, 2018). Sin embargo, estos últimos ejemplos son considerados como GRAS (generalmente reconocidos como seguros, por sus siglas en inglés) de acuerdo con la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés), y pueden ser usados para consumo en humanos (Cantabrana *et al.*, 2015). En complemento a lo anterior, existen otras características por lo que este género de hongo resulta

interesante para la aplicación en alimentos, crece a temperatura ambiente (25 a 35 °C), durante su crecimiento produce hidrolasas como amilasas, proteasas y lipasas, que pueden ayudar a incrementar la biodisponibilidad de nutrientes al realizar una hidrólisis en los componentes de la pared celular del material vegetal (Cantabrana *et al.*, 2015; Ghosh y Ray, 2011). Se ha reportado el uso de *Rhizopus* en la fermentación de alimentos para obtener texturas y sabores. En Asia es muy común emplear este hongo para elaborar distintos alimentos como lo son el vino de arroz, quesos, el Tempeh, un fermentado de granos, legumbres o frutas con el hongo *R. oligosporus* o *R. oryzae*, entre otros (Babu *et al.*, 2009; Ibaruri y Hernández, 2018).

### **3. HIPÓTESIS**

La fermentación en medio sólido con *R. oryzae* permitirá potenciar las características fisicoquímicas y funcionales del maíz pigmentado.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Evaluar el proceso de fermentación en medio sólido empleando *R. oryzae* sobre las características fisicoquímicas y funcionales de maíz pigmentado.

### 4.2. Objetivos Específicos

1. Caracterizar fisicoquímicamente el maíz pigmentado y evaluar el crecimiento de *R. oryzae* sobre el grano de maíz pigmentado.
2. Explorar las condiciones de proceso de FMS (temperatura, concentración de inóculo, pH y sales del medio) de maíz pigmentado y seleccionar aquellas que permitan la mayor liberación de compuestos fenólicos y mayor capacidad antioxidante.
3. Evaluar el efecto de la FMS sobre el contenido fisicoquímico de maíz pigmentado bioprocesado a mayor volumen, bajo condiciones de mayor liberación de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Material Vegetal

Para el desarrollo del presente estudio se emplearon granos de maíz azul procedente de la Sierra Tarahumara (Madera, Chihuahua, coordenadas: 29.243298, -108.113481), cosechado en la temporada octubre-noviembre de 2021). El material fue colectado en bolsas negras y se trasladó al laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería del CIAD Delicias, donde fue sometido a un proceso de desinfección mediante radiación UV por 30 min, para ser almacenado protegido de la luz hasta su uso.

### 5.2. Microorganismo

Se empleó el hongo *Rhizopus oryzae*, perteneciente a la colección de cultivos del Departamento de Investigación en Alimentos de la FCQ-UAdeC. La cepa fúngica se mantuvo a -20 °C en una mezcla de glicerol-leche descremada (1:9 v/v) Las esporas fueron reactivadas en agar papa dextrosa (PDA-Bioxon) e incubadas a 30 °C durante 7 días. Ya reactivadas, se inocularon en matraces Erlenmeyer (250 mL) con 30 mL de PDA y se incubaron a 30 °C durante 7 días. Las esporas se colectaron con una solución estéril de Tween-80 al 0.01 % (v/v), se recuperaron y se cuantificaron en una cámara de Neubauer.

### 5.3. ETAPA 1. Caracterización Fisicoquímica y Selección de Tiempo de Fermentación.

#### 5.3.1. Caracterización Fisicoquímica

Se realizó un análisis proximal para conocer la composición física del maíz pigmentado. Para ello,

el grano (60 g) fue molido hasta obtener un polvo fino que se empleó para determinar el contenido de humedad, proteína, grasa, fibra y carbohidratos, de acuerdo con la metodología de la AOAC (1980). Adicionalmente, se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y la capacidad antioxidante (CA) del material vegetal, tanto de la fracción libre (CFT Libre) como la ligada (CFT Ligada). Para obtener el CFT libre de los extractos, se pesaron 3 g de muestra y se agregaron 10 mL de una mezcla de metanol, agua y ácido láctico (80:19:1 v/v/v) como solvente de extracción. La mezcla se sonó (Ultrasonic Cleaner, VWR International, 150D, New York, EUA) durante 5 min, se filtró a través de un papel filtro (25  $\mu\text{m}$ ) y el extracto obtenido fue almacenado en viales Eppendorf en congelación (-20 °C) hasta su uso (Torres-León *et al.*, 2019). Para la fracción ligada, se utilizó la metodología propuesta por Torres-León *et al.* (2019), donde el residuo sólido de la fracción libre se sometió a una hidrólisis alcalina con NaOH 4M durante 4 h a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se ajustó el pH a un intervalo de 2 a 3 con ácido clorhídrico concentrado, se centrifugó 10000 rpm por 5 min en una centrifuga Eppendorf AG (5805F, Alemania). Se recuperó el sobrenadante, y se mezcló con 30 mL de acetato de etilo durante 5 min para extraer los compuestos fenólicos. Finalmente, se eliminó el acetato de etilo en un rotavapor (BUCHI®, B-100 HB, Suiza) a 40 °C. La fracción fenólica se recuperó y reconstituyó con 4 mL del solvente de extracción (Metanol-agua-ácido láctico) y se almacenaron en viales eppendorf a -20 °C hasta su uso.

### 5.3.2. Fermentación en Medio Sólido

Para la FMS, se empleó el grano de maíz como soporte. El grano entero se sometió a un remojo con forme a la metodología de Chen *et al.* (2021) con algunas modificaciones para ajustar la humedad del grano a 35% (2 h de remojo). Se mezclaron 300 g de maíz con 5 mL de medio de sales (1 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) previamente inoculado con 1x10<sup>6</sup> esp/g de *R. oryzae*. La mezcla (12 g de masa húmeda, mh) fue empacada en reactores de charola (54 cm<sup>3</sup>) y se incubaron a 30 °C durante 72 h, tomando muestras cada 12 h. El crecimiento fúngico fue evaluado mediante el registro en tiempo real de la producción de CO<sub>2</sub> y el consumo O<sub>2</sub> empleando un sistema de respirometría (Méndez-González *et al.*, 2022).

Para obtener los extractos de la fracción libre y ligada del maíz fermentado se siguió lo descrito en

la sección 5.3.1. Los extractos obtenidos se emplearon para determinar el contenido de fenoles totales (hidrolizables + condensados), así como la capacidad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP) de la fracción libre. El análisis de estos datos permitió seleccionar el tiempo de máxima liberación de compuestos fenólicos.

#### 5.4. ETAPA 2. Efecto de las Condiciones de Proceso de FMS Sobre la Liberación de Contenido de Fenoles Totales con Capacidad Antioxidante

Una vez seleccionado el tiempo de máxima liberación, se exploraron las condiciones de cultivo. Para ello, se planteó un diseño factorial  $2^k$  Box-Hunter & Hunter que permitió evaluar el efecto de la temperatura, pH, concentración de inóculo y sales en el medio, tal como se indica en el cuadro 2.

Para evaluar las condiciones del proceso de FMS, se llevó a cabo una fermentación empleando el hongo *R. oryzae* y utilizando el tiempo seleccionado previamente en la etapa anterior. El proceso se realizó en reactores de charola ( $54 \text{ cm}^3$ ) empleando el maíz pigmentado como soporte, variando las diferentes condiciones de proceso acorde al cuadro 2. Al final de la fermentación, se procedió a obtener los extractos, tal como se reporta en la sección 5.3. Los extractos obtenidos se emplearon para determinar el contenido de fenoles totales (hidrolizables + condensados) y la capacidad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP), tal como se reportó en la sección 5.3.

De acuerdo con el análisis de resultados, se seleccionaron las mejores condiciones de proceso con máxima liberación de compuestos fenólicos y mayor capacidad antioxidante para realizar una fermentación de mayor volumen.

**Cuadro 2.** Matriz experimental  $2^k$  Box-Hunter & Hunter para evaluar el efecto de la temperatura, concentración de inóculo, pH y concentración de sales ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) sobre el CFT y la CA de maíz pigmentado.

Tratamiento	A	B	C	D	E	F
1	-1	-1	-1	1	1	1
2	1	-1	-1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1
4	1	1	-1	1	-1	-1

5	-1	-1	1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1
8	1	1	1	1	1	1
<b>Código</b>	<b>Factor</b>	<b>Nivel bajo (-1)</b>		<b>Nivel alto (1)</b>		
A	Temperatura (°C)	30		40		
B	pH	5		6		
C	Inóculo (esporas g <sup>-1</sup> )	1x10 <sup>6</sup>		1x10 <sup>7</sup>		
D	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g L <sup>-1</sup> )	1		2		
E	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g L <sup>-1</sup> )	1		2		
F	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g L <sup>-1</sup> )	4		8		

### 5.5. ETAPA 3. Evaluación del Efecto de la FMS a un Volumen Mayor Sobre la Composición Físicoquímica Bajo Condiciones de Mayor Liberación de Fenoles con Capacidad Antioxidante.

Para la etapa 3, se utilizó el mejor tratamiento obtenido de la etapa 2 y se realizó una fermentación a mayor volumen aumentado 25 veces la masa utilizada en la etapa 1 (12 g a 300 g) para poder obtener una materia prima bioprocesada (mediante el secado y molienda del maíz fermentado), la cual se caracterizó mediante los métodos de AOAC (1980). Para ello, se realizó una fermentación a mayor volumen utilizando un reactor de charolas (1183 cm<sup>3</sup>) empleando maíz pigmentado como sustrato utilizando las mejores condiciones de proceso obtenidas en la etapa anterior (temperatura 40 °C, pH 5, tamaño de inóculo 1x10<sup>7</sup> esp g<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2 g L<sup>-1</sup> y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 g L<sup>-1</sup>). Los granos fermentados fueron sometidos a secado y molienda hasta obtener partículas finas (≤1 mm) que se emplearon para realizar el análisis proximal (AOAC, 1980). Los resultados obtenidos se compararon para determinar el efecto de la FMS sobre la composición físicoquímica, CFT y CA del maíz pigmentado.

## 5.6. Métodos analíticos

### 5.6.1. Caracterización Físicoquímica

La composición físicoquímica (humedad, proteína, grasa, fibra cruda y carbohidratos) fue determinada empleando la metodología oficial reportada por la AOAC (1980).

Los granos de maíz fueron molidos y tamizados hasta obtener un polvo fino, al cual se le determinó el contenido de humedad (AOAC 964.22). El polvo obtenido se empleó para determinar el contenido de ceniza (550 °C durante 6 h) conforme a AOAC 923.03 y el contenido de proteína bruta haciendo uso del método de Kjeldahl con un factor de conversión de 6.25, según AOAC 960.52. Para el extracto etéreo (lípidos) se utilizó un sistema Soxhlet conforme a la AOAC 948.22 y la fibra total usando la metodología de AOAC 978.10. El contenido de carbohidratos totales se calculó por diferencia donde se sumaron todos los porcentajes (ceniza, proteína, lípidos y fibra) y se le restaron a un valor de 100.

### 5.6.2. Determinación de Contenido de Fenoles Hidrolizables

El contenido fenólico hidrolizable fue determinado usando el reactivo de Folin-Ciocalteu y expresado en equivalentes de ácido gálico (EAG) acorde a las metodologías descritas por Wong-Paz *et al.* (2014). Brevemente, 20 µL de extracto fueron mezclados con 20 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu en una microplaca, después de 5 min, se añadieron 20 µL de carbonato de sodio (0.01 M) y se dejó reposar por otros 5 min. Pasado este tiempo se añadió 125 µL de agua destilada y la absorbancia fue registrada a 790 nm usando un espectrofotómetro de microplacas MULTISKAN GO (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlandia). Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se expresaron como miligramos de equivalente de ácido gálico por gramo de materia seca (mg EAG gms<sup>-1</sup>), a partir de una curva de calibración de ácido gálico (0-200 mg L<sup>-1</sup>).

### **5.6.3. Determinación de Contenido de Fenoles Condensados**

Se determinó el contenido de fenoles condensados de acuerdo con lo reportado por Hernández *et al.* (2017) adaptado a microplaca. En tubos de tapa roscada, se mezclaron 250  $\mu\text{L}$  de muestra, 1.5 mL de HCl-n-Butanol (10 %) y 50  $\mu\text{L}$  de reactivo férrico (1mL HCl concentrado, 2 g de sulfato férrico de amonio y aforado a 5 mL con agua destilada). Los tubos se calentaron durante 40 min en baño de ebullición a 100 °C, y se enfriaron a temperatura ambiente. Finalmente, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de cada tubo y se registró la absorbancia a 460 nm, utilizando un lector de microplaca MULTISKAN GO. Los resultados se expresaron en equivalentes de catequina por gramo de materia seca ( $\text{mg EC gms}^{-1}$ ), utilizando una curva patrón de catequina (0-1000  $\text{mg L}^{-1}$ ).

### **5.6.4. Determinación de Contenido de Fenoles Totales**

El CFT se obtuvo a partir de la suma del contenido de fenoles hidrolizables y el contenido de fenoles condensados y se expresó como miligramo por gramo de masa seca ( $\text{mg gms}^{-1}$ ).

### **5.6.5. Determinación de Capacidad Antioxidante por DPPH**

Se utilizó el ensayo reportado por Molyneux (2004), adaptado a microplaca. Se mezclaron 7  $\mu\text{L}$  del extracto con 193  $\mu\text{L}$  de solución de DPPH (60  $\mu\text{M}$ ), se dejó reposar 30 min, y se registró la absorbancia a 517 nm en un lector de microplacas. El resultado se expresó como miligramos de equivalentes de Trolox por gramo de materia seca ( $\text{mg ET gms}^{-1}$ ) empleando una curva estándar de Trolox (0-200  $\text{mg L}^{-1}$ ).

### **5.6.6. Determinación de Capacidad Antioxidante por ABTS**

Se realizó con base en lo reportado por Torres-León *et al.* (2019) adaptado a microplaca. Se preparó el reactivo ABTS (2.45 mL de ABTS 7 mM y 12.5 mL de persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) 2.45 mM) y se incubó en oscuridad por 16 h. Posteriormente, se ajustó la absorbancia a  $0.7 \pm 0.2$  a una longitud de onda de 734 nm. Para el ensayo, se mezclaron 10  $\mu$ L de muestra y 190  $\mu$ L del reactivo ABTS<sup>+</sup>. Pasado un min de reacción, se registró la absorbancia en un lector de microplaca. El resultado se expresó como equivalentes de Trolox por gramo de materia seca (mg ET gms<sup>-1</sup>) empleando una curva estándar de Trolox (0-200 mg L<sup>-1</sup>).

### **5.6.7. Determinación de Capacidad Antioxidante por FRAP**

La capacidad de los extractos para reducir el hierro (FRAP, del inglés Ferric Reducing Antioxidant Power) se determinó de acuerdo con Alvarez-Parrilla *et al.* (2005), adaptado a microplaca. El reactivo FRAP se preparó mezclando 50 mL de una solución buffer de acetatos 0.3 M y pH 3.6, 5 mL de una solución TPTZ 10 mM y 5 mL de una solución de cloruro férrico. La solución se mezcló y se dejó reposar a 37 °C por 30 min. Para el ensayo se mezclaron 18  $\mu$ L de agua, 6  $\mu$ L del extracto y 180  $\mu$ L de solución FRAP. Se dejó reposar por 1 hora a 37 °C y se registró la absorbancia a 595 nm en un lector de microplaca. Los resultados se expresaron como mg Fe<sup>+2</sup> gms<sup>-1</sup> utilizando una curva estándar de sulfato de hierro (0-800 mg L<sup>-1</sup>).

### **5.6.8. Análisis Respirométrico**

El crecimiento de *R. oryzae* se estimó de manera indirecta haciendo uso de los parámetros cinéticos de acuerdo con la metodología propuesta por Méndez-González *et al.* (2022). El gas de escape del biorreactor se secó con gel de silica y se introdujo en el analizador respirométrico. Las tasas de

producción de CO<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub>, se obtuvieron a partir de los gradientes de concentración del aire suministrado por el biorreactor y se expresaron como mg por gramo de materia seca inicial por hora (mg g<sub>msi</sub><sup>-1</sup> h). El consumo total de O<sub>2</sub> y producción total de CO<sub>2</sub> se estimaron evaluando el área bajo las tasas de consumo de O<sub>2</sub> y de producción de CO<sub>2</sub> (respectivamente) por el método del trapecio. El tiempo de retraso (Lag) se determinó mediante la intersección de la línea formada por la producción de LnCO<sub>2</sub> frente al tiempo con el eje x. Tanto la cinética asociada a la producción de CO<sub>2</sub>, como la tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> (μ), la producción inicial de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2o</sub>), la producción máxima de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2max</sub>) se determinaron mediante el uso de la ecuación del modelo logístico (Ecuación 1), utilizando el método del gradiente reducido generalizado. Para lo anterior, el rendimiento másico de la producción de CO<sub>2</sub> por O<sub>2</sub> consumido (YCO<sub>2</sub> O<sub>2</sub><sup>-1</sup>) y el coeficiente mantenido (mO<sub>2</sub>) fueron estimados por regresión multilínea. El cociente respiratorio instantáneo (CO<sub>2</sub> O<sub>2</sub><sup>-1</sup>) se determinó a partir de las tasas molares de consumo de O<sub>2</sub> y de producción de CO<sub>2</sub>.

$$CO_2 = \frac{CO_{2max}}{1 + \left[ \left( \frac{CO_{2max}}{CO_{2o}} \right) - 1 \right] e^{-\mu t}} \quad (1)$$

## 5.7. Análisis Estadístico

En la primera fermentación se realizó un diseño completamente al azar para determinar el efecto del tiempo de cultivo sobre el CFT y la CA de extractos de maíz pigmentado fermentado. En la segunda fermentación, se planteó un diseño factorial 2<sup>k</sup> Box-Hunter & Hunter con dos puntos centrales empleando el software Statistica 7.0 (Stat Soft, Tulsa, Ok, USA) para evaluar el efecto del inóculo, la temperatura, pH y sales nutritivas (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) sobre las variables de respuesta (CA (DPPH, ABTS y FRAP) y CF totales (hidrolizables y condensados)). En la tercera etapa se utilizó un diseño completamente al azar para determinar el efecto de la FMS sobre la composición fisicoquímica del maíz pigmentado. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se expresaron como el promedio ± su desviación estándar. Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y, cuando fue necesario, se realizó una prueba de comparación de medias para establecer diferencia entre tratamientos (LSD).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1. ETAPA 1. Caracterización Físicoquímica y Selección de Tiempo de Fermentación.

El maíz (*Zea mays*) es el cereal más producido a nivel mundial seguido del arroz y el trigo (FAOSTAT, 2021). Gran parte de la población humana consume maíz como alimento básico, por tal motivo es de suma importancia conocer la composición química y calidad nutricional del maíz. La composición química de este grano está constituida mayormente por: proteínas, grasas y carbohidratos (principalmente almidón) (Veljković *et al.*, 2018). En el cuadro 3, se muestra la composición físicoquímica del maíz pigmentado, el maíz utilizado para este estudio presentó un contenido de proteína de 9.03 %, grasa 2.34 %, fibra 2.55 % y carbohidratos 84.34 %. los cuales están dentro de los resultados publicados por Paliwal (2001a), el cual realizó un estudio sobre varios maíces, reportando valores proteína (5.2-13.7 %), grasa (2.2-5.7 %), ceniza (1.2-2.9 %), fibra (0.8-2.9 %) y carbohidratos (66-89 %). Los resultados obtenidos son similares en proteína a los reportados por Tiessen-Favier *et al.* (2022), los cuales reportaron un rango de 9.0-10.7 %. Los valores obtenidos para fibra y grasa son 2 y 1.6 veces superiores a lo reportado por Tiessen-Favier *et al.* (2022), respectivamente. Rodríguez-Salinas *et al.* (2020) reportaron valores similares a los aquí obtenidos para la composición físicoquímica de varios maíces pigmentados del noreste de México. Las diferencias se atribuyen principalmente a la variedad de maíz.

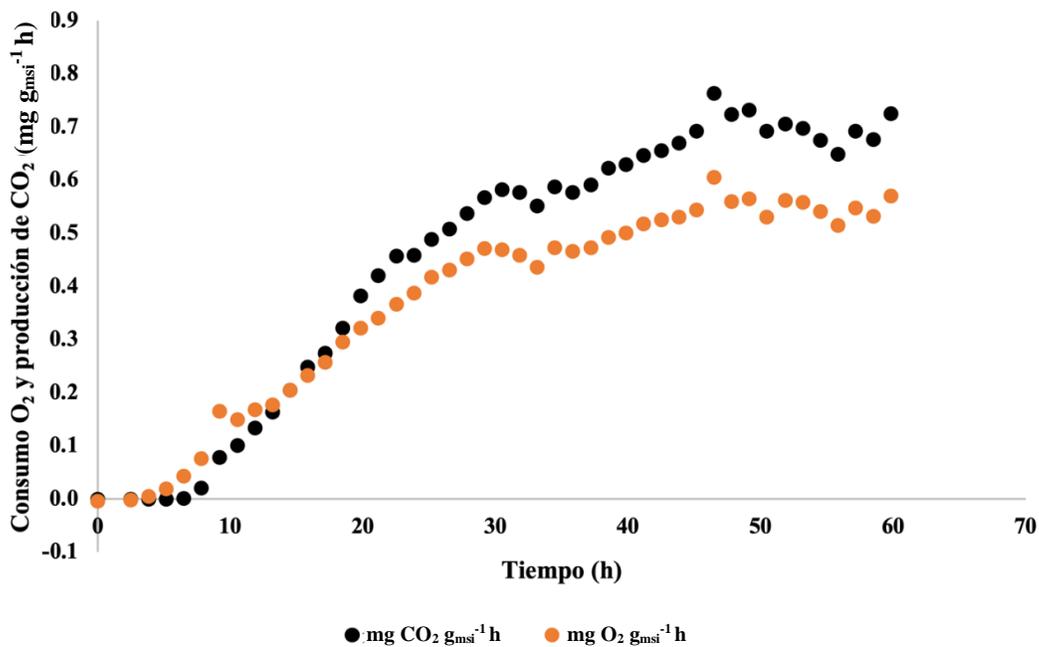
**Cuadro 3.** Composición físicoquímica del maíz pigmentado (g 100g<sup>-1</sup>).

<b>Parámetro</b>	<b>Maíz pigmentado</b>
<b>Proteína</b>	9.031 ± 0.114
<b>Grasa</b>	2.338 ± 0.164
<b>Ceniza</b>	1.694 ± 0.055
<b>Fibra</b>	2.554 ± 0.280
<b>Carbohidratos</b>	84.381 ± 0.165
<b>Lignina</b>	0.151 ± 0.009

Los valores son medias (n =3) y las diferencias entre medias fueron comparadas usando LSD ( $p \leq 0.05$ ).

Con base en su composición, el maíz es una fuente rica en proteína y carbohidratos, lo cual lo convierte en un alimento de sumo interés para su ingesta en la población humana. Asimismo, estas mismas propiedades lo hacen un medio óptimo para el crecimiento de *R. oryzae*, ya que este microorganismo utiliza diferentes fuentes de carbono como lo es glucosa, celulosa entre otras (Liao *et al.*, 2007). El alto contenido de carbohidratos (84 %) en el grano de maíz pigmentado lo hace una excelente fuente de carbono y energía para el microorganismo. A su vez, el microorganismo requiere de una fuente de nitrógeno para llevar a cabo su crecimiento de una forma favorable, algunas de estas fuentes son proteínas o fuentes inorgánicas como sales de amonio, nitratos, entre otras (Abdella *et al.*, 2023; Hsiao *et al.*, 2014). Por su parte, el microorganismo utiliza ácidos grasos para sintetizar lípidos que atienden funciones básicas y forman parte de la membrana celular (Massarolo *et al.*, 2016).

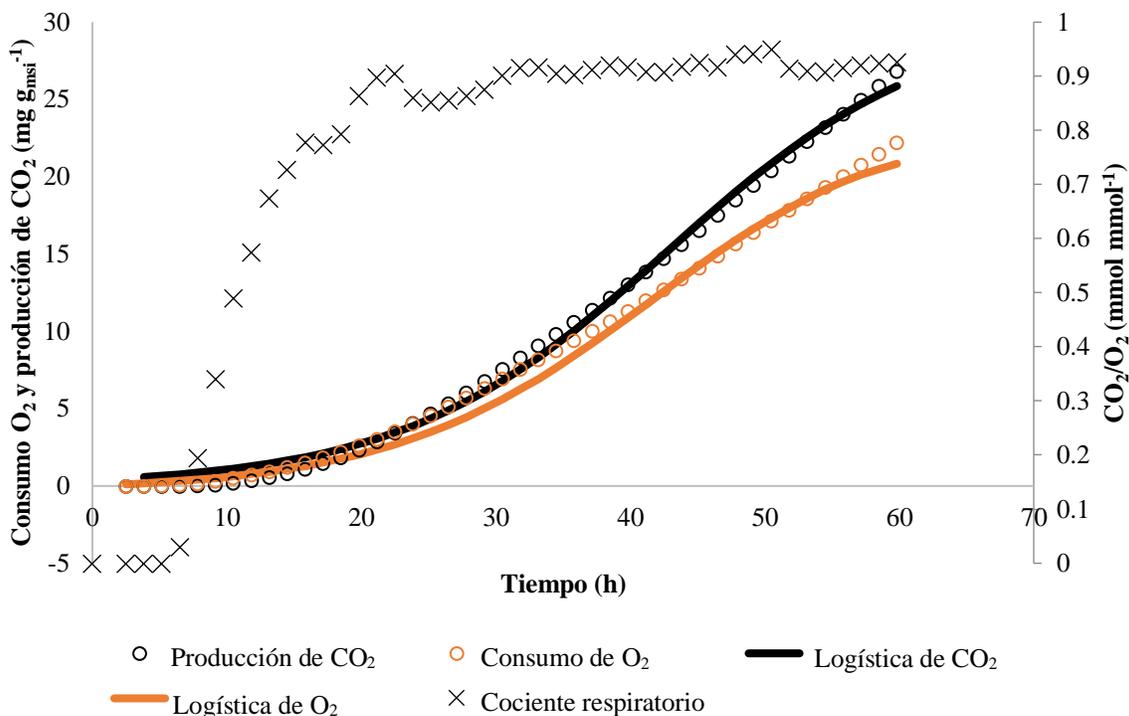
Durante el proceso de fermentación se obtuvieron los parámetros cinéticos asociados al consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub>, mediante el contenido del gas obtenido del biorreactor durante 60 h (Figura 3). A las 46.5 h de proceso, con unas tasas de consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub> de 0.604 y 0.762 mg g<sub>msi</sub><sup>-1</sup> h (miligramos entre gramos de masa seca inicial), respectivamente.



**Figura 3.** Consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub> por *R. oryzae* usando como sustrato maíz pigmentado en reactores de charola.

Durante la respiración aeróbica el  $O_2$  se consume, mientras hay producción de  $CO_2$  (Manan y Webb, 2020). El acumulado de  $CO_2$  se muestra en la figura 4. En dicha figura también se muestran las fases del crecimiento de *R. oryzae* sobre el maíz pigmentado. La fase de adaptación o etapa lag, la cual se define como el tiempo que tarda el microorganismo en adaptar sus funciones básicas en base al sustrato utilizado, la cual muestra un tiempo de adaptación de 6.5 h. La fase de latencia de corta duración es importante en el proceso de FMS debido a que proporciona información sobre la fácil adaptación de los microbios a un sistema heterogéneo. También disminuye el riesgo de contaminación por microorganismos externos (Aguilar-Zárate *et al.*, 2018). La etapa de crecimiento duro 16 h, esta etapa se define como el tiempo de crecimiento exponencial del microorganismo en el sustrato utilizado. Y por último se presentó la etapa de mantenimiento, la cual se define como el tiempo en el que se mostró una desaceleración en el crecimiento y la producción de  $CO_2$  se mantuvo estable durante un periodo de tiempo, la cual duro de las 22.5 h hasta la finalización del proceso de fermentación de 60 h.

El proceso de FMS del maíz pigmentado con *R. oryzae* mostró un consumo máximo de  $O_2$  de 22.204 mg  $g_{msi}^{-1}$  y una producción máxima de  $CO_2$  de 26.807 mg  $g_{msi}^{-1}$  (Figura 4). Los datos experimentales fueron tratados mediante el modelo logístico y se obtuvieron valores de consumo máximo de  $O_2$  de 20.81 mg  $g_{msi}^{-1}$  y una producción máxima de  $CO_2$  de 25.85 mg  $g_{msi}^{-1}$ . Los parámetros cinéticos estimados mediante este modelo resultaron en unos coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de 0.98 y 0.99 para el consumo de  $O_2$  oxígeno y producción de  $CO_2$ , respectivamente (cuadro 4), lo cual indica un buen ajuste de los datos experimentales al modelo logístico. Los valores obtenidos de la cinética de respiración para las 20 a 60 h fueron de 0.77 a 0.95, todos estos valores son de sumo interés, ya que caracterizan la fisiología, el rendimiento de la FMS o el rendimiento total de la fermentación en función del crecimiento microbiano (Manan y Webb, 2020). Los valores mostrados en la figura 3 indican que el proceso se llevó a cabo de manera aeróbica, ayudando esto a la generación de biomasa del hongo (Manan y Webb, 2020; Méndez-González *et al.*, 2022).



**Figura 4.** Cociente respiratorio (X), consumo de O<sub>2</sub> (○) y producción de CO<sub>2</sub> (○) de *R. oryzae* empleando maíz pigmentado como sustrato en FMS. Los círculos representan los datos experimentales y las líneas sólidas representan los datos ajustados al modelo logístico.

**Cuadro 4.** Parámetros cinéticos estimados mediante el modelo logístico.

Modelo logístico	
$\mu = 0.101 \text{ h}^{-1}$	$Y_{\text{CO}_2/\text{O}_2} = 1.068 \text{ mg}_{\text{CO}_2} \text{ mg}_{\text{O}_2}^{-1}$
$\text{CO}_{20} = 0.39 \text{ mg g}_{\text{msi}}^{-1}$	$m_{\text{O}_2} = 5.32 \times 10^{-3} \text{ mg}_{\text{O}_2} \text{ mg}_{\text{CO}_2}^{-1} \text{ h}$
$\text{CO}_{2\text{max}} = 25.86 \text{ mg g}_{\text{msi}}^{-1}$	$\text{O}_{2\text{max}} = 20.81 \text{ mg g}_{\text{msi}}^{-1}$
$R^2 = 0.996$	$R^2 = 0.984$

Los granos de maíz son una fuente importante de polifenoles (Chen *et al.*, 2021). *R. oryzae* tuvo la capacidad de emplear el grano de maíz como sustrato e invadirlo completamente. Durante el proceso de FMS se induce una ruptura estructural de la pared celular del maíz, dando lugar a la liberación de compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos se encuentran en 3 diferentes formas: solubles o hidrolizables, solubles conjugados o condensados, estos están esterificados a azúcares o componentes de bajo peso molecular y los insolubles ligados, que están unidos mediante enlaces covalentes a componentes

de la pared celular (Bei *et al.*, 2017). El CFT libre mostrado en este estudio está compuesto por la suma de las fracciones fenólicas de hidrolizables y condensados, los cuales se muestran en el Cuadro 5 y en la Figura 5.

**Cuadro 5.** Contenido de fenoles hidrolizables y condensados de la fracción libre durante la fermentación de maíz pigmentado.

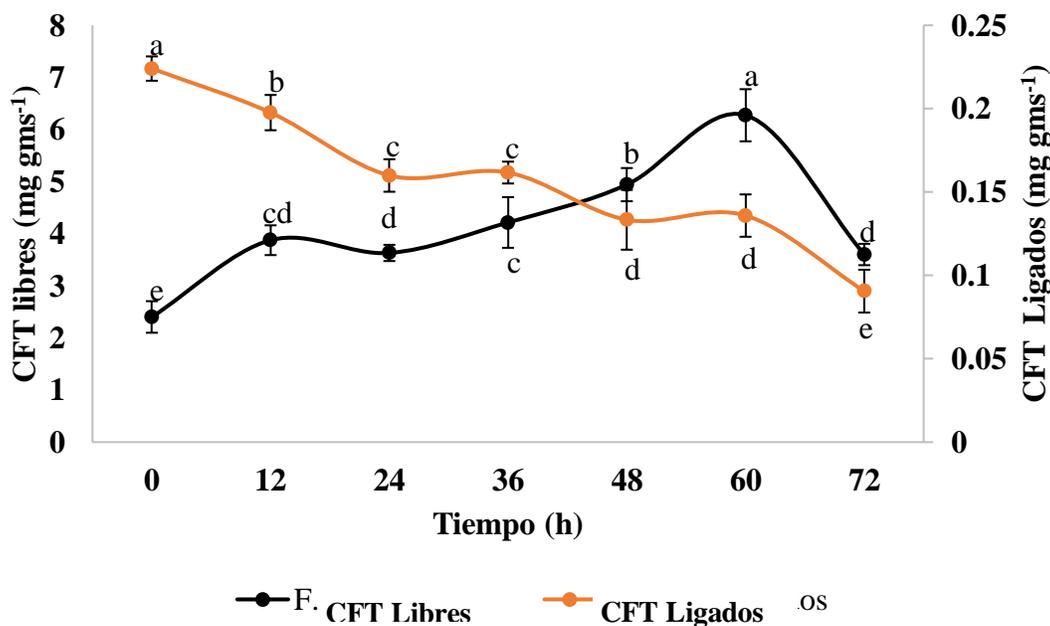
Tiempo	F. hidrolizables (mgEAG gms <sup>-1</sup> )	F. condensados (mg EC gms <sup>-1</sup> )
0	1.314 ± 0.106 <sup>d</sup>	1.088 ± 0.241 <sup>d</sup>
12	2.451 ± 0.194 <sup>bc</sup>	1.425 ± 0.098 <sup>c</sup>
24	2.103 ± 0.091 <sup>c</sup>	1.528 ± 0.207 <sup>c</sup>
36	2.797 ± 0.484 <sup>b</sup>	1.419 ± 0.004 <sup>c</sup>
48	2.787 ± 0.253 <sup>b</sup>	2.155 ± 0.119 <sup>b</sup>
60	3.630 ± 0.362 <sup>a</sup>	2.643 ± 0.267 <sup>a</sup>
72	2.271 ± 0.136 <sup>c</sup>	1.330 ± 0.099 <sup>cd</sup>

Los valores son medias (n =3) y las diferencias entre medias fueron comparadas usando LSD (p ≤ 0.05).

En la figura 4 se muestra la cinética de respiración de *R. oryzae* usando como sustrato maíz pigmentado, donde se pueden apreciar las fases de crecimiento del microorganismo, presentando una etapa de adaptación o lag durante las primeras 8 h de proceso, seguido de una etapa de crecimiento exponencial hasta las 20 h. A partir de las 20 h, se observa una desaceleración y posteriormente la fase de mantenimiento hasta el fin de la FMS. Durante el crecimiento de *R. oryzae*, se producen enzimas que van degradando los componentes de pared celular del maíz, liberando así los compuestos fenólicos ligados a estos componentes (Huynh *et al.*, 2014). Durante el crecimiento de *R. oryzae*, este sintetiza diferentes enzimas como celulasas, hemicelulasas, lipasas y proteasas, las cuales ayudan al rompimiento de los enlaces que mantienen unidos los compuestos fenólicos a la matriz del maíz pigmentado, aumentando así el CFT y CA del maíz pigmentado. El valor más alto de CFT libre se obtuvo a las 60 h de proceso, con un aumento de 161 % con respecto al control (sin fermentar) (Figura 5).

Los resultados aquí mostrados para la fracción libre son 329 % superiores a los reportados por Sánchez Magaña *et al.* (2019) al mismo tiempo de fermentación en maíz variedad Pioneer utilizando *R. oligosporus*. El tiempo de máxima CFT libre coincide con lo reportado por

Buenrostro-Figueroa *et al.* (2017) para la FMS de cáscara de higo con *R. oryzae*. Después de las 60 h, el CFT libre disminuye, lo cual se puede atribuir a la degradación de los compuestos por enzimas del mismo hongo (Starzyńska-Janiszewska *et al.*, 2021).



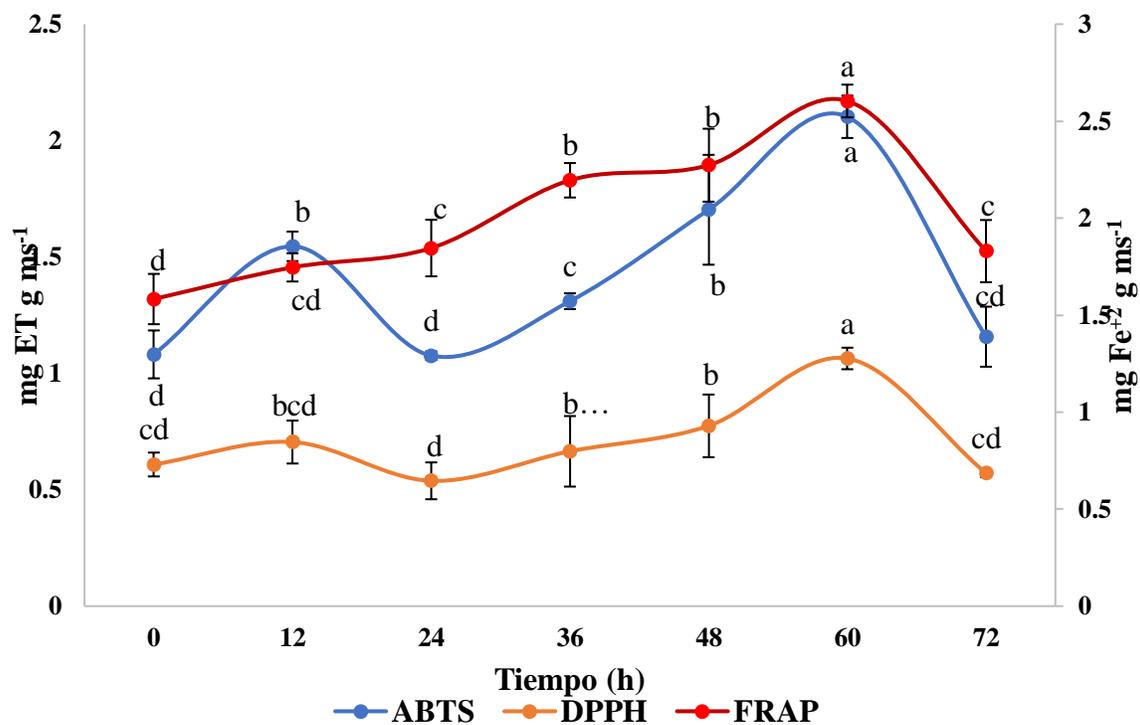
**Figura 5.** Efecto del tiempo de FMS con *R. oryzae* sobre el CFT libres (-●-) y CFT ligados (-○-) de maíz pigmentado.

Como era de esperarse, se puede observar el CFT ligado tuvo una tendencia inversa a CFT libre. Esto quiere decir que el CFT ligado disminuyó conforme aumentaba el tiempo del proceso de fermentación. La liberación de fenoles ligados se puede deber a la acción de las enzimas producidas por el microorganismo durante la fermentación. Esto de acuerdo con diversos estudios donde se reportan las enzimas producidas por *R. oryzae*, como celulasas (Darman *et al.*, 2011), xylanases (Behnam *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2014), lipasas (López *et al.*, 2010; Vaseghi *et al.*, 2013), proteasas (Hsiao *et al.*, 2014), y amilasas (Kaur *et al.*, 2015).

Para cuantificar la CA del grano de maíz pigmentado fermentado se implementaron 3 metodologías: ABTS, DPPH y FRAP. Al igual que en el CFT libre, el proceso de FMS de maíz empleando *R. oryzae* presentó un efecto significativo sobre la CA (Figura 6). El proceso de fermentación aumentó considerablemente la CA del maíz en el ensayo ABTS, con un aumento de

94 % con respecto al grano sin fermentar a las 60 h. La FMS incrementó la CA frente al radical DPPH hasta 74%, comparado con el grano sin fermentar. Los resultados obtenidos para el análisis FRAP mostraron un aumento de 64 % de la CA con respecto al grano sin fermentar. Estos aumentos están relacionados con la liberación de compuestos fenólicos durante el proceso de fermentación (Bei *et al.*, 2017).

Diversos estudios han demostrado el efecto positivo de la FMS sobre el aumento en la CA. Queiroz Santos *et al.* (2018) reportaron un incremento de 70 % de la CA (DPPH) en granos de soya fermentados con *Saccharomyces cerevisiae*. En orujo de uva sometido a FMS con *R. Oryzae*, Leite *et al.* (2019) registraron un aumento de 170 % para la CA respecto al control. Wu *et al.* (2022) desarrollaron un proceso de FMS utilizado avena como sustrato, empleando como inóculo una mezcla de *Lactobacillus plantatum* y *R. oryzae*. Los autores reportaron incrementos en la CA del material fermentado después de 72 h, con aumentos de 104% , 110 % y 172 % superiores comparado al material sin fermentar, similares a los reportados en el presente estudio.



**Figura 6.** Efecto del tiempo de FMS sobre la capacidad antioxidante DPPH (-o-), ABTS (-o-) y FRAP (-o-) de maíz pigmentado.

Finalmente, se estimaron los coeficientes de correlación de Pearson, para estimar la relación que existe entre la CFT libre y CA el del maíz fermentado (Cuadro 6). Como se puede observar, existe una fuerte correlación positiva altamente significativa ( $p < 0.001$ ) entre el CFT libres y la CA frente a los tres ensayos evaluados (DPPH, ABTS y FRAP), lo cual confirma que el aumento de la CA se debe al aumento de los CFT liberados durante el proceso de FMS con *R. oryzae*.

**Cuadro 6.** Coeficientes de correlación de Pearson que indican la asociación entre variables de respuesta.

	ABTS	DPPH	FRAP	CFT libre
ABTS	1	0.896**	0.780**	0.886**
DPPH		1	0.758**	0.818**
FRAP			1	0.868**
CFT libre				1

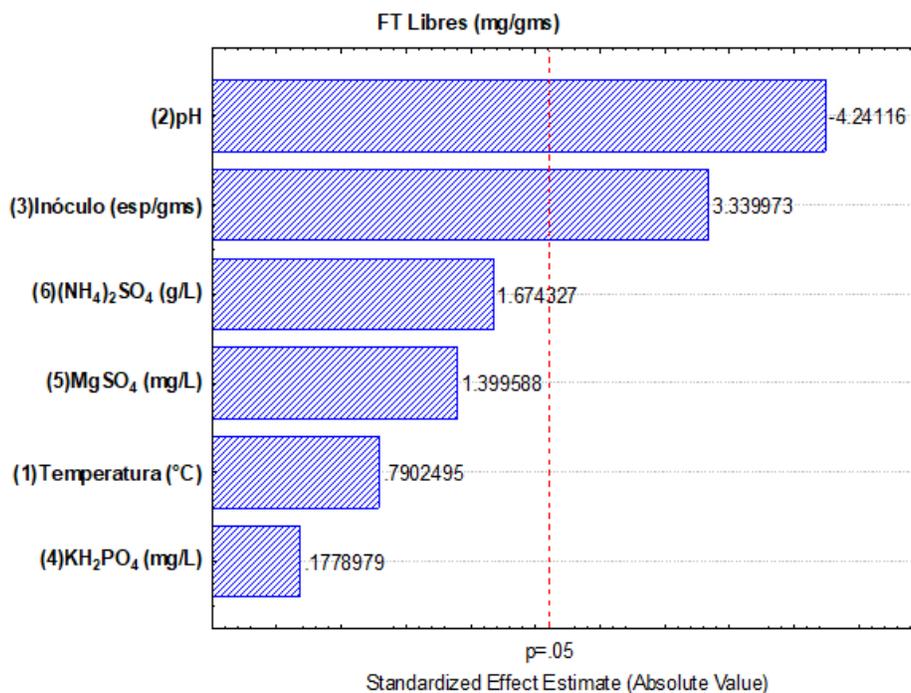
\*\* $p < 0.0001$

Se obtuvo un aumento de CFT libre de 161 % con *R. oryzae* con respecto al maíz sin fermentar a un tiempo de cultivo de 60 h. Por lo tanto, se seleccionó este tiempo de fermentación con esta cepa para las siguientes etapas de la investigación con el fin de maximizar la liberación de los compuestos fenólicos ligados en el maíz pigmentado.

## 6.2. ETAPA 2. Efecto de las Condiciones de Proceso de FMS Sobre la Liberación de Contenido de Fenoles Totales con Capacidad Antioxidante.

En esta etapa, se evaluó el efecto de diversos factores del proceso de FMS (temperatura, pH, tamaño de inóculo, y concentración de sales ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) mediante el uso de un diseño experimental  $2^k$  sobre CFT libre de maíz pigmentado con *R. oryzae*.

En la figura 7 se muestra el diagrama de Pareto que categoriza el efecto de cada factor evaluado sobre la variable de respuesta, siendo significativo aquél que rebasa la línea central punteada.



**Figura 7.** Diagrama de Pareto para CFT libres.

A partir de los diagramas de Pareto, en el cuadro 7 se presenta un resumen del efecto de cada uno de los factores evaluados sobre las variables de respuesta (CFT libre y CA). Como se puede apreciar, el factor que tuvo un efecto significativo sobre todas las variables de respuesta fue el pH, teniendo una correlación negativa para cada variable de respuesta analizada. Lo anterior indica que, a medida que se aumenta el pH inicial del medio, los valores de las variables de respuesta disminuyen. Este comportamiento se atribuye a que cada microorganismo tiene un valor de pH óptimo para su crecimiento, y los cambios de pH inciden directamente sobre el desarrollo del microorganismo en el grano de maíz, afectando la actividad y estabilidad de las enzimas que produce el microorganismo durante su metabolismo, y a su vez, cada microorganismo tiene un pH óptimo de crecimiento (Srivastava *et al.*, 2019). Asimismo, al existir una correlación positiva entre CFT y la CA, el pH también afecta a ésta.

**Cuadro 7.** Efecto de las condiciones del proceso sobre el contenido fenólico y capacidad antioxidante del maíz pigmentado.

Factor	CFT libre	ABTS	DPPH	FRAP
Temperatura (°C)	NS	NS	NS	NS
pH	-	-	-	-
Inóculo (Esporas g <sup>-1</sup> )	+	NS	NS	NS
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g L <sup>-1</sup> )	NS	+	NS	NS
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g L <sup>-1</sup> )	NS	NS	+	NS
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g L <sup>-1</sup> )	NS	NS	NS	-
NS: No significativo				

Por otro lado, el tamaño de inóculo mostró una correlación positiva, lo que nos indica que a medida que aumenta la concentración de inóculo se ve favorecida la liberación de CFT libre. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Egbune *et al.* (2022), quienes obtuvieron un aumento en el contenido de CFT libre conforme aumentaban el tamaño de inóculo utilizando mijo como sustrato para *R. oligosporus*. El KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> presentó una correlación positiva, lo que indica que, al aumentar la concentración de esta sal, aumenta la CA frente al radical ABTS, de igual manera, el MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O tuvo un efecto similar pero frente al radical DPPH. Fan *et al.* (2018) reportaron un comportamiento similar en donde a una mayor concentración de iones K<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup> en diversos sustratos, mayor era la CA frente a los radicales ABTS y DPPH, respectivamente. El sulfato de amonio presentó una correlación negativa respecto a la CA determinada mediante el ensayo FRAP, esto puede deberse a que *R. oryzae* es capaz de producir sideróforos, los cuales son compuestos quelantes de hierro (Holzberg y Artis, 1983). Por lo tanto, al haber presencia de estos agentes quelantes, pueden interferir en la determinación de CA por el ensayo de FRAP (Echegaray *et al.*, 2021). Cabe resaltar que no existen referencias que hagan énfasis en el efecto que tienen estas sales directamente sobre las metodologías de CA aquí evaluadas. Por lo tanto, no se descarta que los datos estén sobreestimados debido a interferencias en la determinación de la CA. Esto debido a diversos factores que pueden alterar los resultados de estos métodos. Por ejemplo, compuestos fenólicos como antocianinas, ácido cafeico y ácido ferúlico, los cuales se han reportado que se encuentran en el maíz, reaccionan lentamente con el reactivo FRAP (Echegaray *et al.*, 2021), debido a esto, es posible que el tiempo de reacción utilizado en la metodología haya sido poco para

poder reportar el verdadero potencial antioxidante de los compuestos presentes en los extractos fermentados de cascalote. Una desventaja que tiene el ensayo de DPPH es que existen compuestos que absorben a la misma longitud de onda, lo cual sobreestima el resultado. Por otra parte, el ensayo se realiza empleando un disolvente orgánico, lo cual puede inhabilitar la determinación de la CA de compuestos solubles en agua, algo que no sucede en el método ABTS, en el cual es posible determinar la CA de compuestos hidrófilos (Echegaray *et al.*, 2021; Shah y Modi, 2015).

En el cuadro 8 se muestran los resultados de CFT libres para cada uno de los tratamientos, donde la máxima liberación de CFT libre se presentó en el tratamiento 6 (5.549 mg gms<sup>-1</sup>), 1.15 veces mayor respecto al tratamiento 3, que presentó el valor más bajo. Teniendo así un aumento de 115% entre el mejor tratamiento y el menor.

**Cuadro 8.** Matriz BHH utilizada para evaluar el efecto de 6 factores (A, B, C, D, E Y F) sobre CFT libre de maíz pigmentado con *R. oryzae* en FMS.

Tratamiento	A	B	C	D	E	F	CFT libre (mg gms <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	-1	1	1	1	4.986 ± 0.238 <sup>b</sup>
2	1	-1	-1	-1	-1	1	3.892 ± 0.253 <sup>c</sup>
3	-1	1	-1	-1	1	-1	2.580 ± 0.110 <sup>e</sup>
4	1	1	-1	1	-1	-1	3.372 ± 0.263 <sup>d</sup>
5	-1	-1	1	1	-1	-1	4.153 ± 0.136 <sup>c</sup>
<b>6</b>	<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>5.549 ± 0.041<sup>a</sup></b>
7	-1	1	1	-1	-1	1	4.373 ± 0.378 <sup>c</sup>
8	1	1	1	1	1	1	4.059 ± 0.572 <sup>c</sup>

Código	Factor	(-1)	(1)
A	Temperatura (°C)	30	40
B	pH	5	6
C	Inóculo (Esporas g <sup>-1</sup> )	1x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>7</sup>
D	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g L <sup>-1</sup> )	1	2
E	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g L <sup>-1</sup> )	1	2
F	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g L <sup>-1</sup> )	4	8

Los valores son medias (n =3) y las diferencias entre medias fueron comparadas usando LSD (p ≤ 0.05).

Considerando los resultados obtenidos, las condiciones que aseguran una mayor liberación de CFT libres a partir de maíz pigmentado fermentado con *R. oryzae* fueron: temperatura 40 °C, pH 5, tamaño de inóculo  $1 \times 10^7$  esp/g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 g/L y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4 g/L. Teniendo estos resultados y el mejor tiempo de fermentación, se procedió a realizar una fermentación a mayor volumen, utilizando el mejor tiempo de fermentación y el mejor tratamiento para evaluar su efecto sobre el maíz pigmentado.

### 6.3. ETAPA 3. Evaluación del Efecto de la FMS a un Volumen Mayor Sobre la Composición Fisicoquímica Bajo Condiciones de Mayor Liberación de Fenoles con Capacidad Antioxidante.

En esta etapa se evaluó el efecto de la FMS sobre la composición química y CA del maíz pigmentado usando *R. oryzae*, en la figura 8 se muestra el crecimiento que tuvo *R. oryzae* sobre el grano de maíz pigmentado a las 60 h de cultivo utilizando las condiciones de mayor liberación de CFT con CA obtenidas por el tratamiento 6, en dicha figura, en las imágenes inferiores se puede apreciar de una manera más detallada el desarrollo del micelio durante el proceso de fermentación. Los resultados obtenidos para la composición fisicoquímica, CFT libre y CA se muestran en el cuadro 9.



**Figura 8.** Crecimiento de *R. oryzae* sobre maíz pigmentado, control sin fermentar (izq) y fermentado a las 60 h con tratamiento 6 (der).

Al comparar el material fermentado con el control, se observó un incremento del 10 % en el contenido de proteína. Este valor es igual al reportado por Sukma *et al.* (2021), quienes fermentaron arroz con *R. oryzae*. En otro estudio, se usó arroz como sustrato en FMS con *R. oryzae*, (Kupski *et al.* (2012). Los autores reportaron un aumento del 14.7 % de proteína respecto al control. Este incremento en el contenido de proteína puede atribuirse a que el microorganismo utilizó el sustrato como fuente de carbono y de energía durante la FMS, para crecer y así aumentar su biomasa y por ende, aumentar el contenido de proteína fúngica (Olukomaiya *et al.*, 2020).

El contenido de grasa después del proceso de FMS tuvo un aumento de 186 % veces en comparación con el maíz sin fermentar, esto puede deberse a que durante el crecimiento de microorganismo, este utiliza los nutrientes disponibles para sintetizar lípidos que forman parte de los componentes del micelio (Denardi-Souza *et al.*, 2018). Por otra parte, se ha reportado que *R. oryzae* produce lipasas, enzimas que degradan lípidos que estén ligados a otros componentes del

maíz, como azúcares o proteínas (Londoño-Hernández *et al.*, 2017; López-Fernández *et al.*, 2020). Conforme al contenido de fibra, se observó una disminución del 8%, similar al 5 % reportado por Sukma *et al.* (2022), en una harina de plátano fermentada con *R. oryzae*. Olugosi *et al.* (2019) reportaron una disminución del 5 % por efecto de la fermentación de harina de cáscara de cocoa con *R. stolonifer*. Lo anterior se atribuye al hecho que *R. oryzae* tiene la capacidad de producir enzimas que degradan la pared celular, como lo son celulasas, hemicelulasas y proteasas, entre otras (Londoño-Hernández *et al.*, 2017).

Respecto al contenido de carbohidratos se observó una disminución del 3%, igual al reportado Sukma *et al.* (2022) en harina de plátano fermentada con *R. oryzae*. Durante su crecimiento y desarrollo, *R. oryzae* enzimas que degradan los polisacáridos en fracciones simples como glucosa, los cuales posteriormente el hongo emplea como fuente de carbono para desarrollar su biomasa, resultando así en la disminución del contenido de carbohidratos (Pandey y Negi, 2020; Sukma *et al.*, 2022).

**Cuadro 9.** Efecto de FMS sobre la composición fisicoquímica a (g/100g), CFT libre (mg/gms) y CA del maíz pigmentado.

Parámetro	Control	Fermentado
<b>Proteína</b>	9.031 ± 0.110 <sup>b</sup>	9.944 ± 0.240 <sup>a</sup>
<b>Grasa</b>	2.338 ± 0.164 <sup>c</sup>	4.353 ± 0.164 <sup>a</sup>
<b>Ceniza</b>	1.320 ± 0.093 <sup>b</sup>	1.694 ± 0.055 <sup>a</sup>
<b>Fibra</b>	2.554 ± 0.280 <sup>a</sup>	2.350 ± 0.050 <sup>b</sup>
<b>Carbohidratos</b>	84.381 ± 0.165 <sup>a</sup>	82.031 ± 0.324 <sup>b</sup>
<b>Lignina</b>	0.151 ± 0.009 <sup>a</sup>	0.150 ± 0.025 <sup>a</sup>
<b>CFT libre</b>	2.401 ± 0.30 <sup>b</sup>	5.55 ± 0.041 <sup>a</sup>
<b>ABTS (mg ET/gms)</b>	1.081 ± 0.103 <sup>b</sup>	1.701 ± 0.037 <sup>a</sup>
<b>DPPH (mg ET/gms)</b>	0.608 ± 0.051 <sup>b</sup>	0.933 ± 0.101 <sup>a</sup>
<b>FRAP (mg EFe<sup>+2</sup> /gms)</b>	1.583 ± 0.130 <sup>b</sup>	2.401 ± 0.018 <sup>a</sup>

Los valores son medias (n =3) y las diferencias entre medias fueron comparadas usando LSD (p ≤ 0.05).

Al comparar el CFT libre, se observó un aumento del 131% respecto al grano sin fermentar, valor similar a lo reportado por Chen *et al.* (2021), quienes aumentaron hasta 125 % el contenido fenólico de maíz fermentado con *Monascus anka*. Buenrostro-Figueroa *et al.* (2017) incrementaron 439%

el contenido fenólico en higo fermentado con *R. oryzae* en condiciones de optimización. Por otra parte, se obtuvo un aumento de la capacidad antioxidante hasta 60% con respecto al maíz sin fermentar, este comportamiento de aumento positivo en la CA, es similar a lo reportado por varios autores, como Buenrostro-Figueroa *et al.* (2023) reportaron un aumento de hasta 481% en la CA en un proceso optimizado, utilizando cáscara de granada fermentada con *A. niger*, Janarny y Gunathilake (2020), haciendo uso de diferentes tipos de arroz y *R. oryzae*, lograron un aumento de CA de hasta 44% en comparación con el arroz sin fermentar. También Dulf *et al.* (2016) utilizando ciruelas y haciendo uso de dos cepas fúngicas *A. niger* y *R. oligosporus*, logro un aumento del 35% en la CA. Estos resultados demuestran la eficiencia de la FMS como alternativa para aumentar el contenido de CFT y CA en matrices vegetales. Conforme a los valores obtenidos se presentó una correlación positiva entre CFT y CA, lo que nos indica que al mismo tiempo que se liberan los compuestos fenólicos ligados a componentes de la matriz vegetal, por acción de las enzimas liberadas durante el crecimiento de *R. oryzae*, la CA aumenta de igual manera. Dicho aumento es consecuencia de la degradación de los componentes de la pared celular del maíz pigmentado, en la cual se encuentran algunos compuestos fenólicos, por acción de las enzimas producidas durante el desarrollo de *R. oryzae* sobre los granos del maíz (Starzyńska-Janiszewska *et al.*, 2021). El bioproceso desarrollado permitió mejorar las características fisicoquímicas y funcionales del maíz pigmentado, el cual podría ser empleado como materia prima para el desarrollo de alimentos funcionales.

## 7. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio revelaron que la composición química del maíz pigmentado es un buen candidato para ser empleado como sustrato en procesos de FMS. *R. oryzae* fue capaz de crecer empleando el grano de maíz pigmentado como sustrato y única fuente de nutrientes, con los valores obtenidos de la cinética de respiración se dedujo que el proceso se llevó de manera aeróbica, lo que ayudó a la generación de la biomasa del hongo. La máxima liberación de CFT se observó a las 60 h. De los parámetros de proceso evaluados, sólo el pH ejerció un efecto sobre el CFT y la CA. Las mejores condiciones de FMS de maíz pigmentado con *R. oryzae* fueron: temperatura 40 °C, pH 5, tamaño de inóculo  $1 \times 10^7$  esp/g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 g/L y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4 g/L. Bajo estas condiciones, la FMS de maíz pigmentado con *R. oryzae* permitió incrementar 10 % el contenido de proteína, disminuyendo 8 y 3 % el contenido de carbohidratos y fibra, respectivamente. La FMS de *R. oryzae* incrementó 131 % la extracción de CFT libres, con un aumento de hasta 60 % en la capacidad antioxidante de los extractos fermentados.

El bioproceso propuesto permitió potenciar las características fisicoquímicas y funcionales del maíz pigmentado. Con base en estas mejoras, el grano bioprocesado podría ser empleado como materia prima para el desarrollo de alimentos funcionales, debido a su alta capacidad antioxidante y mejoras en su composición química.

## 8. RECOMENDACIONES

Elucidar el perfil de compuestos fenólicos presentes a lo largo del proceso de FMS, así como las enzimas asociadas a la liberación de los compuestos fenólicos a partir del bioprocesamiento del grano.

Optimizar el proceso de FMS de maíz pigmentado con *R. oryzae* y escalar a mayor volumen.

Desarrollar alimentos funcionales a partir del grano bioprocesado.

## 9. REFERENCIAS

- Abdella, A., Al-Saman, M., Abou-Elazm, F. I., & El-Far, S. W. (2023). *Rhizopus oryzae* Inulinase Production and Characterization with Application in Chicory Root Saccharification. *Microbiology Research*, 14(1), 297-315.
- Abril-Ibarra, Z. 2022. Antioxidantes producidos por microorganismos acuáticos y terrestres con uso potencial en cosméticos. *Actualidades Biológicas*, 44(116).
- Adebo, O. A., & Gabriela Medina-Meza, I. 2020. Impact of Fermentation on the Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Whole Cereal Grains: A Mini Review. *Molecules*, 25(4).
- Aguilar-Zárate, P., Wong-Paz, J. E., Rodríguez-Duran, L. V., Buenrostro-Figueroa, J., Michel, M., Saucedo-Castañeda, G., Favela-Torres, E., Ascacio-Valdés, J. A., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. 2018. On-line monitoring of *Aspergillus niger* GH1 growth in a bioprocess for the production of ellagic acid and ellagitannase by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 247, 412-418.
- Alvarez-Parrilla, E., Rosa, L. A. D. L., Torres-Rivas, F., Rodrigo-Garcia, J., & González-Aguilar, G. A. 2005. Complexation of Apple Antioxidants: Chlorogenic Acid, Quercetin and Rutin by  $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -CD). *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 53(1), 121-129.
- Alves Magro, A. E., & de Castro, R. J. S. 2020. Effects of solid-state fermentation and extraction solvents on the antioxidant properties of lentils. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101753.
- AOAC. 1980. *Official methods of analysis of AOAC International*. 13th edition ed., Gaithersburg, MD.
- Aoki, H., Chuma, S., Iba, Y., Tashiro, H., Watanabe, N., & Oyama, H. 2020. Comparison of Bioactive Components in Tempeh Produced by Three Different *Rhizopus* Starters and Immunomodulatory Effect of Tempeh on Atopic Dermatitis Mice. *Food Science and Technology Research*, 26(5), 665-672.
- Arias Lamos, D., Montaña Díaz, L. N., Velasco Sánchez, M. A., & Martínez Girón, J. 2018. Alimentos funcionales: avances de aplicación en agroindustria. *Tecnura*, 22(57), 55-68.
- Babu, P. D., Bhakyaraj, R., & Vidhyalakshmi, R. 2009. A low cost nutritious food “tempeh”-a review. *World J Dairy Food Sci*, 4(1), 22-27.
- Behnam, S., Karimi, K., Khanahmadi, M., & Salimian, Z. 2016. Optimization of xylanase production by *Mucor indicus*, *Mucor hiemalis*, and *Rhizopus oryzae* through solid state fermentation.
- Bei, Q., Liu, Y., Wang, L., Chen, G., & Wu, Z. 2017. Improving free, conjugated, and bound phenolic fractions in fermented oats (*Avena sativa* L.) with *Monascus anka* and their antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 32, 185-194.
- Bello-Pérez, L. A., Camelo-Mendez, G. A., Agama-Acevedo, E., & Utrilla-Coello, R. G. 2016.

Aspecto nutraceuticos de los maíces pigmentados: digestibilidad de los carbohidratos y antocianinas. *Agrociencia*, 50(8), 1041-1063.

- Benítez-Estrada, A., Villanueva-Sánchez, J., González-Rosendo, G., Alcántar-Rodríguez, V. E., Puga-Díaz, R., & Quintero-Gutiérrez, A. G. 2020. Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP). *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 23.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239(1), 70-76.
- Buenrostro-Figueroa, J. J., Nevárez-Moorillón, G. V., Chávez-González, M. L., Sepúlveda, L., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilar, C. N., Pedroza-Islas, R., Huerta-Ochoa, S., & Arely Prado-Barragán, L. (2023). Improved Extraction of High Value-Added Polyphenols from Pomegranate Peel by Solid-State Fermentation. *Fermentation*, 9(6).
- Buenrostro-Figueroa, J. J., Velázquez, M., Flores-Ortega, O., Ascacio-Valdés, J. A., Huerta-Ochoa, S., Aguilar, C. N., & Prado-Barragán, L. A. 2017. Solid state fermentation of fig (*Ficus carica L.*) by-products using fungi to obtain phenolic compounds with antioxidant activity and qualitative evaluation of phenolics obtained. *Process Biochemistry*, 62, 16-23.
- Cámpora, M. C. 2016. Alimentos funcionales: tecnología que hace la diferencia. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 42(2), 131-137.
- Cantabrana, I., Perise, R., & Hernández, I. 2015. Uses of *Rhizopus oryzae* in the kitchen. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 2(2), 103-111.
- Chávez-González, M. L., Buenrostro-Figueroa, J. J., & Aguilar, C. N. 2018. *Handbook of Research on Food Science and Technology: Volume 2: Food Biotechnology and Microbiology*. CRC Press. 1st ed.,
- Chen, G., Chen, B., & Song, D. 2021. Co-microbiological regulation of phenolic release through solid-state fermentation of corn kernels (*Zea mays L.*) to improve their antioxidant activity. *LWT*, 142, 111003.
- Cuevas Mejía, J. d. J. 2014. Maíz: Alimento fundamental en las tradiciones y costumbres mexicanas.
- Cuevas-Rodríguez, E. O., Mián-Carrillo, J., Mora-Escobedo, R., Cárdenas-Valenzuela, O. G., & Reyes-Moreno, C. 2004. Quality protein maize (*Zea mays L.*) tempeh flour through solid state fermentation process. *LWT - Food Science and Technology*, 37(1), 59-67.
- Darman, R. D., Ngang, J., & Etoa, F. 2011. Cassava solid-state fermentation with a starter culture of *Lactobacillus plantarum* and *Rhizopus oryzae* for cellulase production. *African Journal of Microbiology Research*, 5(27), 4866-4872.
- Denardi-Souza, T., Massarolo, K. C., Tralamazza, S. M., & Badiale-Furlong, E. 2018. Monitoring of fungal biomass changed by *Rhizopus oryzae* in relation to amino acid and essential fatty acids profile in soybean meal, wheat and rice. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 156-164.
- Dey, T. B., & Kuhad, R. C. 2014a. Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with *Rhizopus oryzae* RCK2012. *Biotechnology Reports*, 4, 120-127.

- Dey, T. B., & Kuhad, R. C. 2014b. Upgrading the antioxidant potential of cereals by their fungal fermentation under solid-state cultivation conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 59(5), 493-499.
- Dulf, F. V., Vodnar, D. C., Dulf, E.-H., & Pinteá, A. 2017. Phenolic compounds, flavonoids, lipids and antioxidant potential of apricot (*Prunus armeniaca* L.) pomace fermented by two filamentous fungal strains in solid state system. *Chemistry Central Journal*, 11(1), 92.
- Dulf, F. V., Vodnar, D. C., Dulf, E.-H., & Toşa, M. I. 2015. Total Phenolic Contents, Antioxidant Activities, and Lipid Fractions from Berry Pomaces Obtained by Solid-State Fermentation of Two Sambucus Species with *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(13), 3489-3500.
- Dulf, F. V., Vodnar, D. C., & Socaciu, C. 2016. Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-products. *Food Chemistry*, 209, 27-36.
- Echegaray, N., Pateiro, M., Munekata, P. E. S., Lorenzo, J. M., Chabani, Z., Farag, M. A., & Domínguez, R. (2021). Measurement of Antioxidant Capacity of Meat and Meat Products: Methods and Applications. *Molecules*, 26(13).
- Egbune, E. O., Orhonigbe, I., Adheigu, R. O., Oniyan, U. P., & Tonukari, N. J. 2022. Effect of inoculum size on solid state fermentation of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) by *Rhizopus oligosporus*. *NIGERIAN JOURNAL OF SCIENCE AND ENVIRONMENT*, 19(1).
- Fan, M., Sun, X., Qian, Y., Xu, Y., Wang, D., & Cao, Y. 2018. Effects of metal ions in tea polysaccharides on their in vitro antioxidant activity and hypoglycemic activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 418-426.
- FAOSTAT. (2021). *Food and agriculture organization of the United Nations*. FAO. Recuperado Junio 1 de <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
- Fernández Suárez, R., Morales Chávez, L. A., & Gálvez Mariscal, A. 2013. Importancia de los maíces nativos de México en la dieta nacional: Una revisión indispensable. *Revista fitotecnica mexicana*, 36, 275-283.
- Flores, F. P., Singh, R. K., & Kong, F. 2016. Anthocyanin extraction, microencapsulation, and release properties during in vitro digestion. *Food Reviews International*, 32(1), 46-67.
- Ghosh, B., & Ray, R. R. 2011. Current commercial perspective of *Rhizopus oryzae*: a review. *J Appl Sci*, 11(14), 2470-2486.
- González-Muñoz, A., Quesille-Villalobos, A. M., Fuentealba, C., Shetty, K., & Gálvez Ranilla, L. 2013. Potential of Chilean Native Corn (*Zea mays* L.) Accessions as Natural Sources of Phenolic Antioxidants and in Vitro Bioactivity for Hyperglycemia and Hypertension Management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), 10995-11007.
- Gul, K., Singh, A. K., & Jabeen, R. 2016. Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future World. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(16), 2617-2627.
- Gwirtz, J. A., & Garcia-Casal, M. N. 2014. Processing maize flour and corn meal food products. *Ann N Y Acad Sci*, 1312(1), 66-75.
- Hernández, C., Ascacio-Valdés, J., De la Garza, H., Wong-Paz, J., Aguilar, C. N., Martínez-Ávila, G. C., Castro-López, C., & Aguilera-Carbó, A. 2017. Polyphenolic content, in vitro

- antioxidant activity and chemical composition of extract from *Nephelium lappaceum* L. (Mexican rambutan) husk. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(12), 1201-1205.
- Hernández, M., Ventura, J., Castro, C., Boone, V., Rojas, R., Ascacio-Valdés, J., & Martínez-Ávila, G. (2018). UPLC-ESI-QTOF-MS2-Based Identification and Antioxidant Activity Assessment of Phenolic Compounds from Red Corn Cob (*Zea mays* L.). *Molecules*, 23(6).
- Holzberg, M., & Artis, W. M. 1983. Hydroxamate siderophore production by opportunistic and systemic fungal pathogens. *Infect Immun*, 40(3), 1134-1139.
- Hsiao, N.-W., Chen, Y., Kuan, Y.-C., Lee, Y.-C., Lee, S.-K., Chan, H.-H., & Kao, C.-H. 2014. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(2), 89-94.
- Huynh, N. T., Van Camp, J., Smagghe, G., & Raes, K. 2014. Improved Release and Metabolism of Flavonoids by Steered Fermentation Processes: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11).
- Ibarruri, J., & Hernández, I. 2018. *Rhizopus oryzae* as Fermentation Agent in Food Derived Sub-products. *Waste and Biomass Valorization*, 9(11), 2107-2115.
- Janarny, G., & Gunathilake, K. D. P. P. 2020. Changes in rice bran bioactives, their bioactivity, bioaccessibility and bioavailability with solid-state fermentation by *Rhizopus oryzae*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101510.
- Jiang, K., Tang, B., Wang, Q., Xu, Z., Sun, L., Ma, J., Li, S., Xu, H., & Lei, P. 2019. The bio-processing of soybean dregs by solid state fermentation using a poly  $\gamma$ -glutamic acid producing strain and its effect as feed additive. *Bioresource Technology*, 291, 121841.
- Kaur, H., Arora, M., Bhatia, S., & Alam, M. 2015. Optimization of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase production in solid state fermentation of deoiled rice bran (DRB) by *Rhizopus oryzae*. *Int J Pure App Biosci*, 3, 249-256.
- Kupski, L., Cipolatti, E., Rocha, M. d., Oliveira, M. d. S., Souza-Soares, L. d. A., & Badiale-Furlong, E. 2012. Solid-state fermentation for the enrichment and extraction of proteins and antioxidant compounds in rice bran by *Rhizopus oryzae*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55.
- Lao, F., & Giusti, M. M. 2017. The effect of pigment matrix, temperature and amount of carrier on the yield and final color properties of spray dried purple corn (*Zea mays* L.) cob anthocyanin powders. *Food Chemistry*, 227, 376-382.
- Lao, F., Sigurdson, G. T., & Giusti, M. M. 2017. Health Benefits of Purple Corn (*Zea mays* L.) Phenolic Compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 234-246.
- Leite, P., Silva, C., Salgado, J. M., & Belo, I. 2019. Simultaneous production of lignocellulolytic enzymes and extraction of antioxidant compounds by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. *Industrial Crops and Products*, 137, 315-322.
- Liao, W., Liu, Y., Frear, C., & Chen, S. 2007. A new approach of pellet formation of a filamentous fungus – *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*, 98(18), 3415-3423.
- Lima, M. d. S., da Conceição Prudêncio Dutra, M., Toaldo, I. M., Corrêa, L. C., Pereira, G. E., de Oliveira, D., Bordignon-Luiz, M. T., & Ninow, J. L. 2015. Phenolic compounds, organic

- acids and antioxidant activity of grape juices produced in industrial scale by different processes of maceration. *Food Chemistry*, 188, 384-392.
- Loarca-Piña, G., Neri, M., Figueroa, J. d. D., Castaño-Tostado, E., Ramos-Gómez, M., Reynoso, R., & Mendoza, S. 2019. Chemical characterization, antioxidant and antimutagenic evaluations of pigmented corn. *Journal of Food Science and Technology*, 56(7), 3177-3184.
- Londoño-Hernández, L., Ramírez-Toro, C., Ruiz, H. A., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilar-Gonzalez, M. A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. 2017. *Rhizopus oryzae* – Ancient microbial resource with importance in modern food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 110-127.
- López, E., Deive, F. J., Longo, M. A., & Sanromán, M. A. 2010. Strategies for utilisation of food-processing wastes to produce lipases in solid-state cultures of *Rhizopus oryzae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(8), 929-935.
- López-Alarcón, C., & Denicola, A. 2013. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10.
- López-Fernández, J., Benaiges, M. D., & Valero, F. (2020). *Rhizopus oryzae* Lipase, a Promising Industrial Enzyme: Biochemical Characteristics, Production and Biocatalytic Applications. *Catalysts*, 10(11).
- Manan, M. A., & Webb, C. 2020. Newly designed multi-stacked circular tray solid-state bioreactor: analysis of a distributed parameter gas balance during solid-state fermentation with influence of variable initial moisture content arrangements. *Bioresources and Bioprocessing*, 7(1), 16.
- Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., & Banerjee, U. 2005. Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2(1), 1-9.
- Marsh, A. J., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. 2014. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 38(2), 113-124.
- Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. 2011. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 29(3), 365-373.
- Martirosyan, D., Kanya, H., & Nadalet, C. 2021. Can functional foods reduce the risk of disease? Advancement of functional food definition and steps to create functional food products. *Functional Foods in Health and Disease*, 11(5), 213-221.
- Massarolo, K. C., de Souza, T. D., Ribeiro, A. C., Furlong, E. B., & de Souza Soares, L. A. 2016. Influence of cultivation *Rhizopus oryzae* on rice bran on lipid fraction: Fatty acids and phospholipids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, 204-208.
- Méndez-González, F., Chávez-Escalante, G., & Loera, O. 2022. What does respirometric analysis tell us about *Metarhizium robertsii*. *J Appl Biotechnol Bioeng*, 9(4), 94-96.
- Mercado-Mercado, G., Rosa Carrillo, L. d. l., Wall-Medrano, A., López Díaz, J. A., & Álvarez-Parrilla, E. 2013. Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*, 28, 36-46.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for

- estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26(2), 211-219.
- Olugosi, O., Agbede, J., Adebayo, I., Onibi, G., & Ayeni, O. 2019. Nutritional enhancement of cocoa pod husk meal through fermentation using *Rhizopus stolonifer*. *African Journal of Biotechnology*, 18(30), 901-908.
- Olukomaiya, O. O., Adiamo, O. Q., Fernando, W. C., Mereddy, R., Li, X., & Sultanbawa, Y. 2020. Effect of solid-state fermentation on proximate composition, anti-nutritional factor, microbiological and functional properties of lupin flour. *Food Chemistry*, 315, 126238.
- Ongkowijoyo, P., Luna-Vital, D. A., & Gonzalez de Mejia, E. 2018. Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: An update. *Food Chemistry*, 250, 113-126.
- Othman, B., & Sebo, N. H. 2023. Utilization of Some Agro Wastes for the Production of Acid Protease by *Aspergillus niger*. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 10(3S), 4319-4331.
- Oude Griep, L. M., Geleijnse, J. M., Kromhout, D., Ocké, M. C., & Verschuren, W. M. M. 2010. Raw and Processed Fruit and Vegetable Consumption and 10-Year Coronary Heart Disease Incidence in a Population-Based Cohort Study in the Netherlands. *PLOS ONE*, 5(10), e13609.
- Paliwal, R. L. 2001a. *El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción*. Food & Agriculture Org.
- Paliwal, R. L. 2001b. Introducción al maíz y su importancia. En *El maíz en los trópicos. Mejoramiento y producción* Colección FAO: Producción y Protección Vegetal, Roma, 1-3.
- Pandey, A. K., & Negi, S. 2020. Enhanced cellulase recovery in SSF from *Rhizopus oryzae* SN5 and immobilization for multi-batch saccharification of carboxymethylcellulose. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 101656.
- Paulsmeyer, M., Chatham, L., Becker, T., West, M., West, L., & Juvik, J. 2017. Survey of Anthocyanin Composition and Concentration in Diverse Maize Germplasms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(21), 4341-4350.
- Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. 2014. Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81.
- Queiroz Santos, V., Nascimento, C., Schmidt, C., Mantovani, D., & Dekker, R. (2018). H., & da Cunha, MAA (2018). Solid-state fermentation of soybean okara: Isoflavones biotransformation, antioxidant activity and enhancement of nutritional quality. In: LWT.
- Ravichandran, S., & R, V. 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *International Journal of Science and Nature*, 3, 480-486.
- Rodríguez-Salinas, P. A., Zavala-García, F., Urías-Orona, V., Muy-Rangel, D., Heredia, J. B., & Niño-Medina, G. 2020. Chromatic, Nutritional and Nutraceutical Properties of Pigmented Native Maize (*Zea mays L.*) Genotypes from the Northeast of Mexico. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 45(1), 95-112.
- Rouf Shah, T., Prasad, K., & Kumar, P. 2016. Maize—A potential source of human nutrition and health: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1166995.

- Ruiz, D., Egea, J., Gil, M. I., & Tomás-Barberán, F. A. 2005. Characterization and Quantitation of Phenolic Compounds in New Apricot (*Prunus armeniaca* L.) Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9544-9552.
- Sánchez Magaña, L., Reyes Moreno, C., Jorge, M.-C., Mora Rochin, S., León-López, L., Gutiérrez Dorado, R., & Cuevas-Rodríguez, E.-O. 2019. Influence of solid-state bioconversion by *Rhizopus oligosporus* on antioxidant activity and phenolic compounds Of Maize (*Zea Mays* L.). *Agrociencia*, 53, 45-57.
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. 2019. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *Antioxidants*, 10, 1-29.
- Shah, P., & Modi, H. 2015. Comparative study of DPPH, ABTS and FRAP assays for determination of antioxidant activity. *Int. J. Res. Appl. Sci. Eng. Technol*, 3(6), 636-641.
- Sierra-Macías, M., Andrés-Meza, P., Palafox-Caballero, A., Meneses-Márquez, I., Francisco-Nicolás, N., Zambada-Martínez, A., Rodríguez-Montalvo, F., Espinosa-Calderón, A., & Tadeo-Robledo, M. 2014. Variación morfológica de maíces nativos (*Zea mays* L.) en el estado de Veracruz, México. *AGROProductividad*, 7(1), 58-66.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. 2017. Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. *Food Research International*, 101, 1-16.
- Srivastava, N., Srivastava, M., Ramteke, P. W., & Mishra, P. K. 2019. Chapter 23 - Solid-State Fermentation Strategy for Microbial Metabolites Production: An Overview. En V. K. Gupta & A. Pandey (Ed.). *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* Elsevier, Amsterdam, 345-354.
- Starzyńska-Janiszewska, A., Stodolak, B., Mickowska, B., & Socha, R. 2021. Fermentation with edible *Rhizopus* strains as a beneficial alternative method in wheat germ cake processing. *Journal of Cereal Science*, 102, 103309.
- Streimikyte, P., Viskelis, P., & Viskelis, J. 2022. Enzymes-Assisted Extraction of Plants for Sustainable and Functional Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4).
- Sukma, A., Anwar, H., & Ikhsanudin, A. 2022. Effect of *Rhizopus oryzae* fermentation on proximate composition, anti-nutrient contents, and functional properties of banana peel flour. *International Food Research Journal* 24 (2): 734-740 (April 2017), 29(5), 1205-1214.
- Sukma, A., Oktavianty, H., & Sumardiono, S. 2021. Optimization of solid-state fermentation condition for crude protein enrichment of rice bran using *Rhizopus oryzae* in tray bioreactor. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 26(1), 33-40.
- Tiessen-Favier, A., Escalante-Aburto, A., Espinosa-Leal, C., & García-Lara, S. (2022). Novel Combination of the Biophysical, Nutritional, and Nutraceutical Properties in Subtropical Pigmented Maize Hybrids. *Plants*, 11(23).
- Torres-León, C., Ramírez-Guzmán, N., Ascacio-Valdés, J., Serna-Cock, L., dos Santos Correia, M. T., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. 2019. Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* to enhance the phenolic contents and antioxidative activity of Mexican mango seed: A promising source of natural antioxidants. *LWT*, 112, 108236.
- Trigo, Y. M., & Montenegro, J. L. 2002. El maíz en México: biodiversidad y cambios en el consumo. *Análisis económico*, 17(36), 281-303.

- Vaseghi, Z., Najafpour, G. D., Mohseni, S., & Mahjoub, S. 2013. Production of active lipase by *Rhizopus oryzae* from sugarcane bagasse: solid state fermentation in a tray bioreactor. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(2), 283-289.
- Veljković, V. B., Biberdžić, M. O., Banković-Ilić, I. B., Djalović, I. G., Tasić, M. B., Nježić, Z. B., & Stamenković, O. S. 2018. Biodiesel production from corn oil: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 531-548.
- Venturini Copetti, M. 2019. Yeasts and molds in fermented food production: an ancient bioprocess. *Current Opinion in Food Science*, 25, 57-61.
- Wilkes, H. G. 1985. Teosinte: The closest relative of maize. *Maydica*, 30, 209-223.
- Wong-Paz, J. E., Muñoz-Márquez, D. B., Aguilar-Zárate, P., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. 2014. Microplate quantification of total phenolic content from plant extracts obtained by conventional and ultrasound methods. *Phytochem Anal*, 25(5), 439-444.
- Wu, H., Liu, H.-N., Ma, A.-M., Zhou, J.-Z., & Xia, X.-D. 2022. Synergetic effects of *Lactobacillus plantarum* and *Rhizopus oryzae* on physicochemical, nutritional and antioxidant properties of whole-grain oats (*Avena sativa* L.) during solid-state fermentation. *LWT*, 154, 112687.
- Xiao, Z., Grosse, S., Bergeron, H., & Lau, P. C. K. 2014. Cloning and characterization of the first GH10 and GH11 xylanases from *Rhizopus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(19), 8211-8222.
- Yang, Z., & Zhai, W. 2010. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 169-176.