Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Determinación de fitatos durante la fermentación espontánea e inducida con *Saccharomyces cerevisiae* comercial de masas madre de harina de quinua negra Collana y amarilla Kancolla

TESIS

Para optar el Título Profesional de Química Farmacéutica

AUTORES

Yesica Yeni HUAROC CANCHARI

Gina Smith INGA LEVIZACA

ASESORES

Mg. Nelson BAUTISTA CRUZ

Mg. Robert Dante ALMONACID ROMÁN

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Huaroc Y, Inga G. Determinación de fitatos durante la fermentación espontánea e inducida con *Saccharomyces cerevisiae* comercial de masas madre de harina de quinua negra Collana y amarilla Kancolla [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2024.

Metadatos complementarios

Datos del autor 1	
Nombres y apellidos	Yesica Yeni Huaroc Canchari
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de identificación	70440466
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0001-2892-1763
Datos del autor 2	
Nombres y apellidos	Gina Smith Inga Levizaca
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de identificación	70119899
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0005-1176-131X
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Nelson Bautista Cruz
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de identificación	10260086
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-0932-2332
Datos de cosesor	
Nombres y apellidos	Robert Dante Almonacid Román
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de identificación	40493000
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4865-3820
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Gladys Constanza Arias Arroyo

Tipo de documento de identidad	DNI
Número de identificación	06518454
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Gloria Marina Marín Vallejos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de identificación	09690135
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Celia Bertha Vargas de la Cruz
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de identificación	42354741
Datos de investigación	
Línea de investigación	Microorganismos de interés industrial, ambiental y bioprocesos
Grupo de investigación	Innovación, desarrollo y evaluación de productos funcionales - IDEPF
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Laboratorio de Microbiología País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Calle: Jr. Puno N°1002 Latitud: -12.05572 Longitud: -77.02324
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2022-2023
URL de disciplinas OCDE	https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.04.00

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Determinación de fitatos durante la fermentación espontánea e inducida con *Saccharomyces cerevisiae* comercial de masas madre de harina de quinua negra Collana y amarilla Kancolla

Que presentan las Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

YESICA YENI HUAROC CANCHARI Y
GINA SMITH INGA LEVIZACA

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, ha obtenido la siguiente calificación final:

DIECISIETE (17) aprobado con mención honrosa.

de conformidad con el Art. 14.° del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la obtención del Título Profesional de Químico Farmacéutico (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Lima, 05 de agosto de 2024.

Dra. Gladys Constanza Arias Arroyo
Presidente

Mg. Gloria Marina Marín Vallejos
Miembro

Mg. Celia Bertha Vargas de la Cruz
Miembro

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico – Lima 1 – Perú
Teléfonos: (511) 619-7000 anexo 4826 Ap. Postal 4559 – Lima 1
E-mail: decanofyb@unmsm.edu.pe http://farmacia.unmsm.edu.pe

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. DECANA DE AMÉRICA.
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, NELSON BAUTISTA CRUZ, identificado con DNI N°10260086 en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Decanal N°000443-2024-D-FFB/UNMSM de la tesis cuyo título es: **"Determinación de fitatos durante la fermentación espontánea e inducida con *Saccharomyces cerevisiae* comercial de masas madre de harina de quinua negra Collana y amarilla Kancolla"**, presentada por las bachilleres **Yesica Yeni Huaroc Canchari** y **Gina Smith Inga Levizaca,** para optar el título profesional de Químico Farmacéutico.

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 6 % de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.
Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, para la obtención del título profesional de Químico Farmacéutico.

Jardín Botánico, 25 de julio de 2024



Firma del asesor
DNI: **10260086**
Nelson Bautista Cruz

AGRADECIMIENTOS

Nuestro mayor agradecimiento a Dios por brindarnos la fortaleza, salud y empeño necesarios para el logro de nuestros objetivos.

A nuestra querida familia, especialmente padres, quienes nos apoyaron incondicionalmente en nuestro desarrollo personal y profesional permitiendo lograr muchos de nuestros objetivos lo que significa una inmensa alegría y orgullo. Gracias: Rogelio Huaroc Peralta, Carmen Canchari de la Cruz, Lucila Vila Tobar, Grimaldo Inga Damian y Cirila Levizaca Quispe.

Con mucha estima y reconocimiento, extendemos también nuestra sincera gratitud a nuestros asesores MSc. Nelson Bautista Cruz y Mg. Robert Dante Almonacid Román por su dedicación, paciencia, conocimientos y guía que fueron fundamentales en el desarrollo, dirección y culminación del presente trabajo de investigación.

Nuestra gratitud a la facultad de Farmacia y Bioquímica, especialmente al departamento de microbiología por brindarnos el espacio y los recursos que han sido de gran ayuda en el desarrollo de nuestro trabajo de investigación.

A nuestra querida alma máter, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por brindarnos una educación de calidad y convertirnos en profesionales competentes con altos valores éticos y morales.

ÍNDICE

RESUMEN viii
ABSTRACT ix
I. INTRODUCCIÓN 1
1.1. Planteamiento del problema 1
1.2. Objetivos 2
1.2.1. Objetivo general 2
1.2.2. Objetivos específicos 2
1.3. Importancia y alcance de la presente investigación 2
1.4. Limitaciones de la investigación 3
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA 3
2.1. Antecedentes 3
2.2. Bases teóricas 6
2.2.1. Quinua 6
2.2.2. Variedades de quinua 9
2.2.3. Producción y comercialización 10
2.3. Factores antinutricionales de la quinua 10
2.3.1. Ácido fítico y fitato 11
2.3.2. Efectos negativos del consumo de fitatos en la nutrición 12
2.3.3. Biodisponibilidad fitato-mineral 13
2.4. Estrategias de reducción del fitato 14
2.5. Masa madre 15
2.5.1. Tipos de masa madre 15
2.6. Fitasas 17
2.6.1. Clasificación de las fitasas 18
2.7. Microorganismos productores de fitasas 19
2.7.1. *Saccharomyces cerevisiae* 20
2.8. Definición de términos 22
III. HIPÓTESIS Y VARIABLES 23
3.1. Hipótesis 23
3.2. Variables 23
3.3. Operacionalización de variables 24
IV. MATERIALES Y MÉTODOS 25
4.1. Consideraciones éticas 25

4.2. Área de estudio 25
4.3. Diseño de investigación 25
4.4. Muestra 25
4.5. Métodos 26
4.5.1. Determinación de características organolépticos y fisicoquímicos durante la fermentación espontánea e inducida (*Saccharomyces cerevisiae* comercial) de masas madre de harina de quinua negra y amarilla 26
4.5.2. Identificación de levaduras y BAL con actividad fitasa durante la fermentación espontánea de masas madre de harina de quinua negra Collana y amarilla Kancolla 28
4.5.3. Cuantificación de fitatos durante la fermentación espontánea e inducida *Saccharomyces cerevisiae* comercial de masas madre de harina de quinua negra y amarilla 30
4.6. Análisis estadístico 31
V. RESULTADOS 32
5.1. Determinación de las características organolépticas y fisicoquímicas de las masas madre fermentadas de harina de quinua negra y amarilla. 32
5.2. Aislamiento, selección e Identificación de levaduras y BAL con actividad fitasa. 41
5.3. Cuantificación de fitatos durante proceso de fermentación espontánea e inducida 48
VI. DISCUSIÓN 51
VII. CONCLUSIONES 58
VIII. RECOMENDACIONES 59
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 60
X. ANEXOS 70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la quinua 7
Tabla 2. Valor nutricional de la quinua 7
Tabla 3. Composición de minerales y aminoácidos de la quinua 8
Tabla 4. Valor nutricional de la quinua negra INIA 420 Collana y Kancolla 9
Tabla 5. Contenido de ácido fítico en los principales cereales, semillas oleaginosas, legumbres y nueces 12
Tabla 6. Especies de levaduras productoras de fitasas 20
Tabla 7. Operacionalización de variables 24
Tabla 8. Características fisicoquímicas de harinas de quinua negra y amarilla 32
Tabla 9. Características organolépticas de masas madre durante el tiempo de fermentación espontánea e inducida de quinua negra y amarilla (FEQA, FEQN, FIQA y FIQN) 33
Tabla 10. Variación del pH de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua negra y amarilla (FEQN, FEQA, FIQN y FIQA) 35
Tabla 11. Variación del % de acidez de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua negra y amarilla (FEQN, FEQA, FIQN y FIQA) 38
Tabla 12. Variación del contenido sólidos solubles de masas madre durante el tiempo de fermentación espontánea e inducida de quinua negra y amarilla (FEQN, FEQA, FIQN y FIQA). 40
Tabla 13. Caracterización macroscópica y microscópica de levaduras y BAL aisladas de masas madre durante la FEQN 41
Tabla 14. Caracterización macroscópica y microscópica de levaduras y BAL aisladas de masas madre durante la FEQA 43
Tabla 15. Identificación de levaduras y BAL con actividad fitasa aisladas de masas madre durante la FEQN 45
Tabla 16. Identificación de levaduras y BAL con actividad fitasa aisladas de masas madre durante la FEQA. 45
Tabla 17. Variación de la reducción porcentual de fitatos de masas madre durante el tiempo de fermentación espontánea e inducida de quinua negra y amarilla (FEQN, FEQA, FIQN y FIQA) 49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta y semillas de quinua. 8
Figura 2. Estructura molecular del ácido fítico (mio-inositol 1,2,3,4,5,6 hexafosfato) 11
Figura 3. A y B muestran los efectos del pH y los cationes metálicos divalentes sobre la naturaleza fisiológica del fitato. 13
Figura 4. Tipos de masa madre según los inóculos utilizados. 17
Figura 5. Representación esquemática de la hidrolización de fitatos por fosfatasas ácidas de histidina. 18
Figura 6. Colocación del inicio de hidrólisis de 3 y 6-fitasas. 18
Figura 7. Vías de desfosforilación de IP6 catalizadas por las fitasas de *Candida krusei* (A), *Pichia rhodanensis* (B) y *Saccharomyces cerevisiae* (C). 19
Figura 8. Variación del pH de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua negra (FEQN y FIQN). 34
Figura 9. Variación del pH de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua amarilla (FEQA y FIQA). 35
Figura 10. Variación del % de acidez de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua negra (FEQN y FIQN). 36
Figura 11. Variación del % de acidez de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua amarilla (FEQA y FIQA). 37
Figura 12. Variación del contenido sólidos solubles de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua negra (FEQN y FIQN). 39
Figura 13. Variación de sólidos solubles de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua amarilla (FEQA y FIQA). 40
Figura 14. Morfología de colonias **(**A) y células (B) de levaduras (series 1 y 2); y BAL (serie 5) aisladas de masa madre en la FEQN. 42
Figura 15. Morfología de colonias **(**A) y células (B) de levaduras (series 4 y 5); y BAL (serie 9) aisladas de masa madre en la FEQA. 44
Figura 16. Morfología de las colonias (A) y células (B) de *Saccharomyces cerevisiae* comercial (panadera). 44
Figura 17. Diámetros de halos formados en la hidrólisis del fitato por las fitasas de levaduras y BAL en agar MDF aisladas de masas madre en la FEQN y FEQA. 47
Figura 18. Diámetros del halo formado en la hidrólisis del fitato por fitasas de *Saccharomyces cerevisiae* cepa comercial (panadera) en agar MDF. 47
Figura 19. Variación de la reducción porcentual de fitatos de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua negra (FEQN y FIQN). 48
Figura 20. Variación de la reducción porcentual de fitatos de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua negra (FEQA y FIQA). 49
Figura 21. Imagen de la cuantificación de fitatos en masa madre de harina de quinua. 81
Figura 22. Imagen de tesistas realizando la parte experimental en el laboratorio de Microbiología. 81

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Certificado taxonómico de quinua negra.....70

Anexo 2: Certificado taxonómico de quinua amarilla. 71

Anexo 3: Obtención de la harina de quinua negra y amarilla.....72

Anexo 4: Flujograma de la obtención de masas madre de quinua negra y amarilla……...73

Anexo 5: Obtención de masas madre de harina de quinua negra y amarilla ...74

Anexo 6: Caracterización macroscópica y microscópica de levaduras y BAL aisladas de masas madre durante la FEQN.....74

Anexo 7: Caracterización macroscópica y microscópica de levaduras y BAL aisladas de masas madre durante la FEQA. 76

Anexo 8: Identificación mediante API de cepas seleccionadas de masas madre de harina de quinua negra y amarilla. 79

Anexo 9: Imagen de realización de ensayos 81

Anexo 10: Certificación de quinua negra Collana por INIA-Puno.....82

Anexo 11: Certificación de quinua amarilla Kancolla por INIA-Puno.....82

ABREVIATURAS

BAL: bacterias ácido lácticas

MDF: medio de detección de fitasas

INIA: Instituto Nacional de Innovación Agraria

OMS: Organización Mundial de la Salud

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

MINAGRI: Ministerio de Agricultura y Riego.

ENA: Encuesta Nacional Agropecuaria.

SSE: solución salina estéril

FE: fermentación espontánea

FI: fermentación inducida

FEQN: fermentación espontánea de quinua negra

FEQA: fermentación espontánea de quinua amarilla

FIQN: fermentación inducida de quinua negra

FIQA: fermentación inducida de quinua amarilla

MS: materia seca

DY: rendimiento de masa

RESUMEN

La quinua es un alimento de alto valor nutricional, pero contiene un alto contenido de fitatos, un antinutriente que puede ser reducido en la fermentación tipo masa madre. Por consiguiente, el objetivo de esta investigación fue determinar el contenido de fitatos durante la fermentación espontánea e inducida con *Saccharomyces cerevisiae* comercial de masas madre de harina de quinua negra Collana y amarilla Kancolla. Se realizaron las fermentaciones de las masas por 168h a temperatura ambiente registrando características organolépticas, fisicoquímicas y reducción de fitatos cada 24h. En la fermentación espontánea de quinua negra (FEQN) y amarilla (FEQA) se obtuvo masas con características organolépticas de masa madre entre 48 a 96 h (olor láctico y sabor ácido, mayor volumen), y a 72h los pH cayeron hasta 4,96 y 4,48, los % de acidez aumentaron hasta 0,12 y 0,15 y el contenido de sólidos solubles fue mínimo (1,24 y 0,95 °Brix), además los porcentajes de reducción de fitatos fueron 65,76 y 71,45 % respectivamente. En comparación con la fermentación inducida de quinua negra (FIQN) y amarilla (FIQA) donde las características tipo masa madre se percibieron de 96 a 168h cuando los pH estuvieron en un rango de 4,66 - 4,48, % de acidez de 0,11-0,14, sólidos solubles de 1,10 -1,28 y porcentajes de reducción de fitatos estuvieron entre 73-83%. Asimismo, se aislaron levaduras y bacterias ácido lácticas (BAL) con actividad fitasa siendo las especies más frecuentes *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pelliculosa* y *Lactobacillus plantarum.* Finalmente, se concluyó que las masas madre en la FIQN y FIQA fueron estables y generaron pH óptimos para una mejor degradación de fitatos por más tiempo.

Palabras clave: fitatos, fermentación, masa madre, *Saccharomyces cerevisiae*, fitasa, quinua.

ABSTRACT

Quinoa is a food of high nutritional value, but it contains a high content of phytates, an antinutrient that can be reduced in sourdough-type fermentation. Therefore, the objective of this research was to determine the phytate content during spontaneous and induced fermentation with commercial Saccharomyces cerevisiae of black Collana and yellow Kancolla quinoa flour sourdoughs. The fermentations of the masses were carried out for 168 hours at room temperature, recording organoleptic and physicochemical characteristics and phytate reduction every 24 hours. In the spontaneous fermentation of black (FEQN) and yellow (FEQA) quinoa, masses with organoleptic characteristics of sourdough were obtained between 48 to 96 h (lactic smell and acid flavor, greater volume), and at 72 h the pH fell up to 4.96 and 4.48, the % acidity increased to 0.12 and 0.15 and the soluble solids content was minimal (1.24 and 0.95 °Brix), in addition the percentages of phytate reduction were 65.76 and 71.45% respectively. In comparison with the induced fermentation of black (FIQN) and yellow (FIQA) quinoa where the sourdough-type characteristics were perceived from 96 to 168h when the pH was in a range of 4.66 - 4.48, % acidity of 0 .11-0.14, soluble solids of 1.10 -1.28 and phytate reduction percentages were between 73-83%. Likewise, yeasts and lactic acid bacteria (LAB) with phytase activity were isolated, the most frequent species being *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pelliculosa* and *Lactobacillus plantarum*. Finally, it was concluded that the sourdoughs in FIQN and FIQA were stable and generated optimal pH for a better degradation of phytates for a longer time.

Keywords: phytates, fermentation, sourdough, *Saccharomyces cerevisiae*, phytase, quinoa.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema

En los últimos años el consumo de la quinua ha crecido y se ha diversificado a nivel nacional y mundial, pasando de un recurso marginal de la población andina a un producto apetecido de primer mundo por su alto valor nutricional. Este alimento ya no solo forma parte de dietas comunes y vegetarianas, sino también de dietas especiales, incluso la quinua negra es usada como reconstituyente energético y puede ayudar a prevenir casos de anemia por su alto contenido de minerales, especialmente el hierro [1].

Los minerales son micronutrientes que cumplen funciones vitales en el organismo y deben incorporarse a través de una dieta equilibrada, por lo que es importante fijar la atención en las combinaciones correctas de alimentos y técnicas de preparación para potenciar su biodisponibilidad[2,3].

La quinua es un pseudocereal con excelentes propiedades nutricionales y alto contenido de minerales como potasio, magnesio, hierro, zinc y calcio[4]. El problema con este alimento es su considerable contenido de fitatos entre 0,75-2,47 g/100g materia seca (ms)[5]. Se ha estimado que la ingesta diaria de fitato y otros fosfatos de inositol sobre la base de dietas de estilo occidental varía del 0,3 a 2,6 g y en un rango global de 0,180 a 4,569 g, dependiendo de la dieta seleccionada[6]. Los fitatos tienen un efecto inhibidor sobre la absorción de minerales al formar complejos insolubles con minerales esenciales, por lo que es considerada como antinutriente[7]. Esto puede resultar perjudicial en ciertos sectores vulnerables de la población como en el embarazo, lactantes, niños, mujeres en edad fértil cuyo requerimiento de minerales, especialmente el hierro, es mayor; asimismo, en sectores cuya dieta no es variada o equilibrada (veganos y vegetarianos), el fitato puede afectar la biodisponibilidad de minerales[5,8].

Técnicas como la fermentación pueden ser implementadas a nivel doméstico para reducir el contenido de fitatos y en la fermentación tipo masa madre se reduce el pH por acción de bacterias ácido-lácticas, esto permite la activación de fitasas endógenas y favorece la expresión de fitasas exógenas como el de levaduras y BAL que degradan los fitatos[9]. Por esta razón, la presente investigación pretende evaluar el contenido de fitatos durante la fermentación espontánea e inducida con

Saccharomyces cerevisiae comercial de masas madre de harinas de quinua negra Collana y amarilla Kancolla con la finalidad de encontrar mejoras en la disponibilidad de minerales y potenciar la capacidad nutricional de la quinua.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Evaluar el contenido de fitatos durante la fermentación espontánea e inducida con *Saccharomyces cerevisiae* comercial de masas madre de harina de quinua negra Collana y amarilla Kancolla.

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar características organolépticas y fisicoquímicas durante la fermentación espontánea e inducida de masas madre de harina de quinua negra Collana y amarilla Kancolla.
- Identificar levaduras y BAL con actividad fitasa durante la fermentación espontánea de masas madre de harina de quinua negra Collana y amarilla Kancolla.
- Cuantificar fitatos durante la fermentación espontánea e inducida de masas madre de harina de quinua negra Collana y amarilla Kancolla.

1.3. Importancia y alcance de la presente investigación

La fermentación espontánea o inducida con *Saccharomyces cerevisiae* comercial tienen un impacto positivo en la salud ya que permite la degradación de fitatos e incrementa la absorción de minerales disponibles como hierro, zinc y calcio, por lo que contribuye con la prevención de enfermedades carenciales como la anemia ferropénica[10]. Esta estrategia favorece el acceso a dietas con alto valor nutricional y mejora las propiedades organolépticas como el sabor, aroma y textura de los productos elaborados con este alimento.

Por otro lado, las mejoras que se lograrán con la fermentación incrementarán aún más el consumo de la quinua tanto en las zonas de producción como en otros mercados del Perú. Esto de manera indirecta aumentará la producción mejorando la economía de las familias productoras y la economía del país al aumentar la productividad de la quinua, incluso de otros cereales nativos.

Por último, este trabajo servirá de base para estudios posteriores en otros pseudocereales autóctonos del Perú, donde las técnicas aplicadas puedan ser reproducidas en otros trabajos de investigación y directamente en las comunidades y hogares de la población en general, buscando mejorar la absorción de minerales esenciales.

1.4. Limitaciones de la investigación

El medio de cultivo para la detección de fitasas agar MDF no resultó de acuerdo a la metodología encontrada por lo que se tuvo que realizar modificaciones y adaptación del medio de cultivo.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Antecedentes

Estudios previos indican que la quinua contiene una importante cantidad de fitatos, antinutrientes que podrían reducir su valor nutricional. Técnicas como la fermentación, especialmente tipo masa madre, pueden reducir el contenido de este antinutriente por activación de fitasas endógenas y exógenas (levaduras, BAL).

Arjmand et al.[10], evaluaron los contenidos de ácido fítico en masas de quinua fermentadas a 37°C por 24 h iniciadas con *Saccharomyces cerevisiae* y BAL (*Lactobacillus casei* y *plantarum*) mediante espectrofotometría a 500 nm y la variación de los porcentajes de acidez por titulación realizando las siguientes formulaciones: F1 (masa con *S. cerevisiae)*, F2 (*L. casei*); F3 (*L. plantarum)*; F4 (*L. casei* y *L. plantarum).* Tuvieron como resultado reducciones de 47,58% (F1) en 8 h, 47,63% (F2) y 64,64% (F3) después de 24h, y 56,33% (F4) después de 16h. Respecto a la acidez titulable obtuvieron valores altos en F2 (13,53%) y bajos en F1 (7,16%). Concluyeron que el uso de *Saccharomyces cerevisiae* como iniciador permite mantener condiciones adecuadas para reducir el ácido fítico.

Garcia et al.[11], aislaron, identificaron y caracterizaron levaduras con actividad fitasa de tres masas madre integrales (trigo, centeno y avena). La fermentación se realizó durante 96 h a 25°C, la identificación de las cepas se realizó por PCR-RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico) e ITS (región espaciadora interna transcrita) y la actividad fitasa se detectó en agar MDF (medio de detección de fitasas). Se identificaron un total de 76 aislados siendo las más frecuentes *Candida*

glabrata, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania unispora* y *Wickerhamomyces anomalus*, siendo esta última común en las tres masas de cereales. Asimismo, las cepas aisladas *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Wickerhamomyces anomalus* tuvieron actividad fitasa en agar MDF (1-15 mm de diámetro de hidrólisis).

Canaviri et al.[14], evaluaron la evolución e identificación de microorganismos autóctonos en masas madre espontáneas de quinua blanca por recuento y una combinación de ARNr 16S-API 50CH para lactobacilos respectivamente, también evaluaron la variación del pH durante 168h. El recuento de microorganismos viables aumento a las 24h y a las 96h el recuento de lactobacilos y levaduras fue igual 8,9 (log UFC/g), mientras que el de enterobacterias disminuyó a 3,1(log UFC/g) y cayó después de 5 días. Las BAL aisladas con mayor frecuencia fueron identificadas como *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosus.* Por otro lado, los pH variaron de acuerdo con la evolución de BAL y levaduras con una caída notable a las 24 h de 6,2 a 4,34 y una disminución gradual hasta 192h llegando a un mínimo de 3,94. Concluyeron que el proceso de fermentación espontánea de masas de quinua es lento porque al inicio hay muy poca carga de Lactobacillus.

Franco et al.[15], aislaron e identificaron BAL y levaduras de masa madre de harina de quinua real, rojo, negro por PCR (16S o 26S) y caracterizaron las masas mediante el pH y la acidez titulable. Las levaduras más identificadas fueron *Saccharomyces servazzi* en las masas de quinua roja y negra, mientras que en las comerciales predominaron las *Saccharomyces cerevisiae, Wickerhamomyces anomalus y Pichia kudriavzevii,* asimismo, las BAL destacadas fueron las del género Lactobacillus y Pediococcus, siendo las especies más comunes para varias masas *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus*. En cuanto las características de las masas, los pH tuvieron una disminución notable a las 72 h de 6,5 a 4,1 y acidez titulable fue 0,17. Concluyeron que la masa madre de quinua tiene una población biodiversa y *que P. pentosaceus* podría ser un buen iniciador de masas madre de quinua.

Fekri et al.[9], aislaron e identificaron bacterias ácido-lácticos (LAB) y levaduras de masas madre tradicionales, la capacidad de degradación del fitato de las cepas aisladas usadas como iniciadores y el pH de las masas madre. La identificación fue

por el método de secuenciación del ADN y PCR; y la detección de fitatos se realizó por colorimetría usando UV – visible. En la identificaron se destacaron tres levaduras: *Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces marxianus, y Kluyveromyces aestuarii* y tres bacterias: *Pediococcus pentosaceus, Enterococcus faecium, y Leuconostoc citreum.* La mayor actividad fitasa fue 1,64 U/mL producido por *K. marxianus* en comparación con *S. cerevisiae* (0,97 U/mL) y la cantidad menor de ácido fítico se encontró en masas iniciadas por *K. marxianus* con 17,49 mg/5 g. En cuanto al pH, la masa madre iniciada con *P. pentosaceus* fue menor (3,41) que *S. cerevisiae* (4,92) e indicaron que el pH masa madre varía de 3,5 a 4,5 de acuerdo con el tipo de cultivo y el proceso.

Castro et al.[5], analizaron el contenido de hierro, zinc, calcio, fitato y estimaron la biodisponibilidad de minerales en alimentos como la quinua. Los minerales se identificaron por espectroscopia de absorción atómica, mientras que el contenido de fitatos se realizó por cromatografía iónica de alta resolución (HPLC) y la biodisponibilidad fue estimada mediante relaciones molares fitato/mineral. Se encontró que el contenido de Fe, Zn y Ca fue 4,96, 3,36 y 58,8 mg/ 100g de materia seca de quinua (msq) respectivamente y el contenido de fitato fue 844 mg /100g msq. En cuanto a la estimación de la biodisponibilidad se encontró que la relación molar en quinua fue fitato/hierro 14,5, fitato/zinc 25,0 y fitato/calcio 0,67, lo que indica baja biodisponibilidad de estos nutrientes.

Castro et al.[7], cuantificaron el contenido de fitatos de masas de harinas de quinua fermentadas espontánea e inducidamente con *Lactobacillus plantarum* a 30°C por 48h mediante HPLC, evaluaron el pH y la acidez titulable de las masas y estimaron la biodisponibilidad de hierro, zinc y calcio mediante la relación fitato/mineral luego de la fermentación de las masas. Se encontró mayores porcentajes de degradación en la fermentación inducida (83-85%) en comparación con la espontánea (73-75%), además produjo mayor contenido de ácido láctico 76,8-82,4 g/ Kg de materia seca y una rápida caída del pH hasta 4, asimismo, la accesibilidad a los minerales aumentó de 1,7 a 4,6 veces y la relación fitato/mineral se redujeron de 1,5 a 4,2 veces. Concluyeron que la fermentación inducida con *Lactobacillus plantarum* mejora la accesibilidad a los minerales y la biodisponibilidad estimada en harinas de quinua.

Yildirim et al.[14], realizaron el aislamiento de BAL y evaluaron la degradación de ácido fítico en la fermentación espontánea de harina de trigo integral a diferentes temperaturas. La identificación de BAL se realizó por PCR, el contenido de ácido fítico y la actividad fitasa por espectrofotometría. En total se aislaron 38 BAL, de ellas *Lactobacillus brevis* (803,95 U/mL) y *Lactobacillus plantarum* (797,88 U/mL) tuvieron la actividad fitasa más alta. En cuanto a la degradación de ácido fítico a diferentes temperaturas fue mayor a 35°C (46,15 %).

Rizzello et al.[15], realizaron aislamiento e identificación de BAL con potencial para la elaboración de masa madre de quinua por PCR y elaboraron panes reemplazando un 20% de las masas de pan con masas madre de quinua iniciadas con BAL seleccionadas. Encontraron dos cepas con este potencial: *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rossiae* que se usaron como iniciadores. Los panes con masa madre de quinua mostraron mejores características sensoriales y nutricionales: mayor digestibilidad de proteínas y almidones.

Rosero et al.[16], investigaron la relación entre el contenido de ácido fítico y la actividad fitasa en 4 variedades de quinua: Nariño-Colombia (QC), Anapqui-Bolivia (QBA), IICA–020 Oruro-Bolivia (QB) y Huancavelica-Perú (QP). La cuantificación de ácido fítico se realizó por el método isotacoforético y la actividad fitasa endógena por espectrofotometría UV-visible a 700 nm. Se encontró concentraciones de ácido fítico de 0,979 %, 1,433%, 1,859% y 1,941% en las variedades QC, QBA, QB y QP respectivamente. La variedad QC presentó una alta actividad fitasa (1052 FTU/ Kg) en comparación con las variantes QBA (593 FTU (Phytase Unit o Unidad de Fitasa) / Kg), QB (613 FTU/ Kg) y QP (561 FTU/ Kg), además encontraron una relación negativa (r = -0,89) entre la actividad de la fitasa y el ácido fítico en todas las variedades.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Quinua

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) pertenece a la familia Chenopodiaceae. Es una especie granífera domesticada sobre todo en Perú y Bolivia, adaptable a diferentes climas y condiciones de suelo. Aunque tiene las características de un cereal, es denominada “pseudocereal” o “pseudosemilla” oleaginosa, ya que no

pertenece a la familia de las gramíneas y posee aspectos botánicos como la presencia de inflorescencia tipo panícula y un excelente contenido nutricional: alto en proteínas de calidad (aminoácidos azufrados y lisina) y lípidos[4].
En la tabla 1 se muestra la clasificación taxonómica de la quinua.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la quinua

Taxonomía de la quinua	
División	Magonoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Caryophyllidae
Orden	Caryophyllales
Familia	Chenopodiaceae
Género	*Chenopodium*
Sección	Chenopodia
Subsección	Cellulata
Especie	*Chenopodium quinoa* Willd.

Fuente: tomado de Ministerio de Agricultura y Riego [MINAGRI][17]

Nutricionalmente, las semillas de quinua contienen mayormente carbohidratos (52-69%), es alto en proteínas (16,19%) ricas en aminoácidos esenciales comparables al valor biológico de las proteínas de la leche, también contiene lípidos ricos en ácidos grasos esenciales como linoleico y α-linolénico (2,0 - 9,5%,), antioxidantes (α y γ-tocoferol), fibra dietética soluble (1,3-6,1%), vitaminas B1, B2, B6, C, E y minerales[4]. El valor nutricional de la quinua se detalla a continuación:

Tabla 2. Valor nutricional de la quinua

Descripción	**Valores**
Energía (Kcal)	372,09
Carbohidratos (%)	52-69
Humedad (%)	8,44

Grasa (%)	5,20
Proteínas (%)	16,19
Cenizas	2,00
Fibras	1,84

Fuente: tomado y adaptado del Ministerio de Agricultura y Riego [MINAGRI][17] y Phylo[4]

Tabla 3. Composición de minerales y aminoácidos de la quinua

Minerales	X̄ (mg/kg ms)	Aminoácidos	X̄ (g/100 g proteína)
Calcio	912,25	**Histidina**	2,75
Hierro	87,00	**Isoleucina**	4,63
Zinc	38,78	**Leucina**	6,50
Potasio	8012,00	**Treonina**	3,30
Fósforo	3606,10	**Valina**	4,68
Magnesio	2447,20	**Lisina**	5,60
cobre	25,00	**Triptófano**	1,15

Fuente: tomado y adaptado de Vargas[19], ms: materia seca



Figura 1. Planta y semillas de quinua.

Fuente: tomado de Ceyhun et al.[20]

2.2.2. Variedades de quinua

La quinua es considerada una planta variable ya que puede adaptarse a diferentes suelos, temperatura, precipitaciones, altitud, y periodo vegetativo debido a la gran diversidad genética. En Perú, el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) tiene registrado aproximadamente más de tres mil ecotipos, conservando el material genético alrededor de dos mil ecotipos[21].

Las variedades de la quinua comercial son la quinua blanca, roja y negra. Existen muchas variedades de quinua, según INIA hay alrededor de 100 variedades de las cuales Puno tiene registrados a INIA 420 - Negra Collana, INIA 415 - Pasankalla, Illpa INIA, Kancolla, Salcedo INIA, Blanca de Juli[22].

Kancolla

Esta variante se localiza a nivel del Altiplano localizada en Cabanillas (Puno). Resiste al clima frío y seco de la zona, con lluvias de 450 a 600 mm, de 4˚ a 15˚C temperaturas y suelos que presentan un pH de 5,5 a 8,0 de textura franco arenoso, siendo tolerantes a temperaturas bajas, sequía y humedad. Presenta semillas con granos medianos de color blanco o rosado. Esta quinua tiene un sabor amargo debido al alto contenido de saponinas (0,348 %)[21].

INIA 420 – Negra Collana

Localizada en Suni del altiplano en la región Puno, zona con precipitaciones de 400 a 550 mm y temperaturas entre 4°C a 15°C. Presenta semillas o granos de color negro brillante. Esta variedad es tolerante al Mildiu y contiene 0,0 % de saponinas[21].

Tabla 4. Valor nutricional de la quinua negra INIA 420 Collana y Kancolla

Nutrientes	INIA 420 Negra Collana (%)	Kancolla (%)
Carbohidratos totales	57,2	74,9
Azúcares libres	8,25	5,08
Cenizas	2,13	2,04
Fibras	2,1	2,09
Grasa	5,94	5,84
Humedad	9,88	8,12
Proteína	17,62	16,11

Fuente: tomado y adaptado de Pedrali[23], Navia[24] y Apaza[21]

2.2.3. Producción y comercialización

Las zonas de producción según ENA, en el Perú cuentan con 88 360 productores en granos de quinua. En el 2020, Puno fue la región con mayor producción alrededor del 45,2%, Ayacucho 18% y Apurímac 12,9%. El volumen de producción óptimo es en los meses de abril y mayo, y el volumen de consumo se refleja en la inclusión de la quinua en las dietas diarias de las familias urbanas y rurales, incluso el estado promueve el consumo de la quinua en campañas de alimentación saludable formando parte de programas sociales como Qali Warma y Cuna Más en infantes y niños de poblaciones vulnerables consideradas en situación de pobreza y extrema pobreza**.** La región Puno (zona productora) tiene un mayor consumo de quinua y en Lima Metropolitana hay una tendencia elevada, debido a las costumbres culturales. Podría incrementar la demanda de quinua al existir mayor marketing e información en la forma de prepararla. Los países con mayor consumo de la quinua internacional actualmente son Estados Unidos, Canadá y Francia[17].

Los siguientes países: Francia, Bélgica, España, Austria, Reino Unido y Australia presentaron crecimiento en el volumen de importación de quinua en el 2019 registrando volúmenes de exportación de US$ 94,6 millones para quinua blanca (70,3%), seguido de US$ 23,2 millones para quinua roja (17,3%), US$ 11,4 millones para quinua tricolor (8,4%) y quinua negra con 4%[17].

2.3. Factores antinutricionales de la quinua

Los factores antinutricionales son compuestos derivados del metabolismo secundario de las plantas, presentes en una amplia variedad de alimentos de origen vegetal, que al consumirse reducen su valor nutricional, interfiriendo con su digestibilidad, absorción o utilización de nutrientes, pudiendo perjudicar la salud si se ingiere en altas concentraciones[4]. En la quinua se consideran antinutrientes a las saponinas, ácido fítico, taninos, nitratos, oxalatos e inhibidores de tripsina. Estas sustancias están presentes en concentraciones más altas en las capas externas del grano[25].

2.3.1. Ácido fítico y fitato

El ácido fítico se encuentra conformada por una molécula denominada inositol formado por seis carbonos y cada carbono contiene una molécula de ortofosfato. Los grupos fosfatos se cargan negativamente a pH neutro por lo que interactúan de forma más fácil con moléculas que poseen carga positiva como son las sales minerales mono, di y trivalentes (Cu^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, K^{+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{2+} y Cr^{3+}), la sal formada es denominada fitato. Su fórmula molecular es $C_6H_{18}O_{24}P_6$ y tiene un peso molecular de 660,03[8].

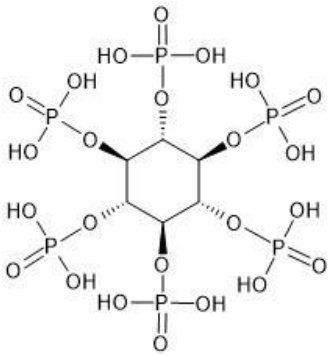


Figura 2. Estructura molecular del ácido fítico (mio-inositol 1,2,3,4,5,6 hexafosfato)

Fuente: tomado de Dailin et al.[8]

El fitato es un compuesto natural abundante en muchas semillas de plantas, representa la principal fuente de fósforo con aproximadamente el 85% del fósforo total en comparación con otras partes de las plantas[26]. En la semilla el ácido fítico se presenta como una combinación de sales con muchos cationes como Mn, K, Ca, Mg, Ca, Fe y Zn y la denominación fitina es utilizado para nombrar a una mezcla de sales de Mg y Ca del ácido fítico[27]**.** El fitato se acumula dentro de los cuerpos proteicos, generalmente de origen vacuolar, en las células de almacenamiento de semillas y generalmente se concentra en inclusiones esféricas llamadas globoides[26].

En quinua, el ácido fítico no solo se localiza en las capas exteriores del grano, como es el caso del centeno y trigo, sino que también se distribuye uniformemente en el endospermo**[4]**. Asimismo, Castro indicó que el contenido de fitato en la quinua fluctúa entre 0,75 a 2,47 % p/p dependiendo de las varidades[5].

Tabla 5. Contenido de ácido fítico en los principales cereales, semillas oleaginosas, legumbres y nueces

Alimento	Ácido fítico g/100g	Referencia
Granos de quinua	0,75 - 2,47	Castro *et al.* 2019
Germen de maíz	6,39	Kasim y Edwards 1998
Salvado de trigo	2,1-7,3	Harland et al. 1986; Sabio 1983
Germen de trigo	1,14-3,91	Sabio 1983
Salvado de arroz	2,56-8,7	Kasim y Edwards 1998; Lehrfeld1994
Cebada	0,38-1,16	Kasim y Edwards 1998
Sorgo	0,57-3,35	Kasim y Edwards 1998
Avena	0,42-1,16	Harland y Oberleas 1986
Centeno	0,54-1,46	Harland y Prosky 1979
Mijo	0,18-1,67	Lestienne *et al*., 2005
Legumbres, frijoles	0,61-2,38	Lehrfeld 1994
Guisantes	0,22-1,22	Ravindram *et al.*, 1994
Garbanzo	0,28-1,60	Ravindram *et al*., 1994
Lentejas	0,27-1,51	Ravindram *et al*., 1994
Soya	1,0-2,22	Lolas *et al*. 1976
Linaza	2,15-3,69	Sabio 1983
Semilla de sésamo	1,44-5,36	Harland y Oberleas 1986
Harina de girasol	3,9-4,3	Kasim y Edwards 1998
Almendras	0,35-9,42	Harland y Oberleas 1986
Nueces	0,20-6,69	Chen 2004
Anacardos	0,19-4,98	Chen 2004

Fuente: tomado y adaptado de Gupta et al.[28] y Castro et al.[5]

2.3.2. Efectos negativos del consumo de fitatos en la nutrición

El ácido fítico tiene iones altamente cargados negativamente en seis grupos fosfato a valores de pH fisiológico, por lo tanto, muestra una afinidad muy fuerte y precipitan fácilmente como sales de fitato al unirse con diferentes cationes minerales como hierro, zinc, potasio, calcio y magnesio. Estos complejos formados afectan negativamente su absorción en el tracto gastrointestinal ya que tanto humanos como animales monogástricos carecen de fitasas en el tracto digestivo para hidrolizar los fitatos presentes en las semillas. En consecuencia, el ácido fítico no

se digiere limitando la biodisponibilidad de minerales y fósforo, motivo por el cual es considerada como un antinutriente[26].

Dependiendo del tipo de cereal consumido y de la cantidad, además del nivel de procesamiento de los alimentos, el consumo diario de fitato puede ser elevado (4500 mg) en dietas no equilibradas o modificadas afectando la biodisponibilidad de los minerales[6].

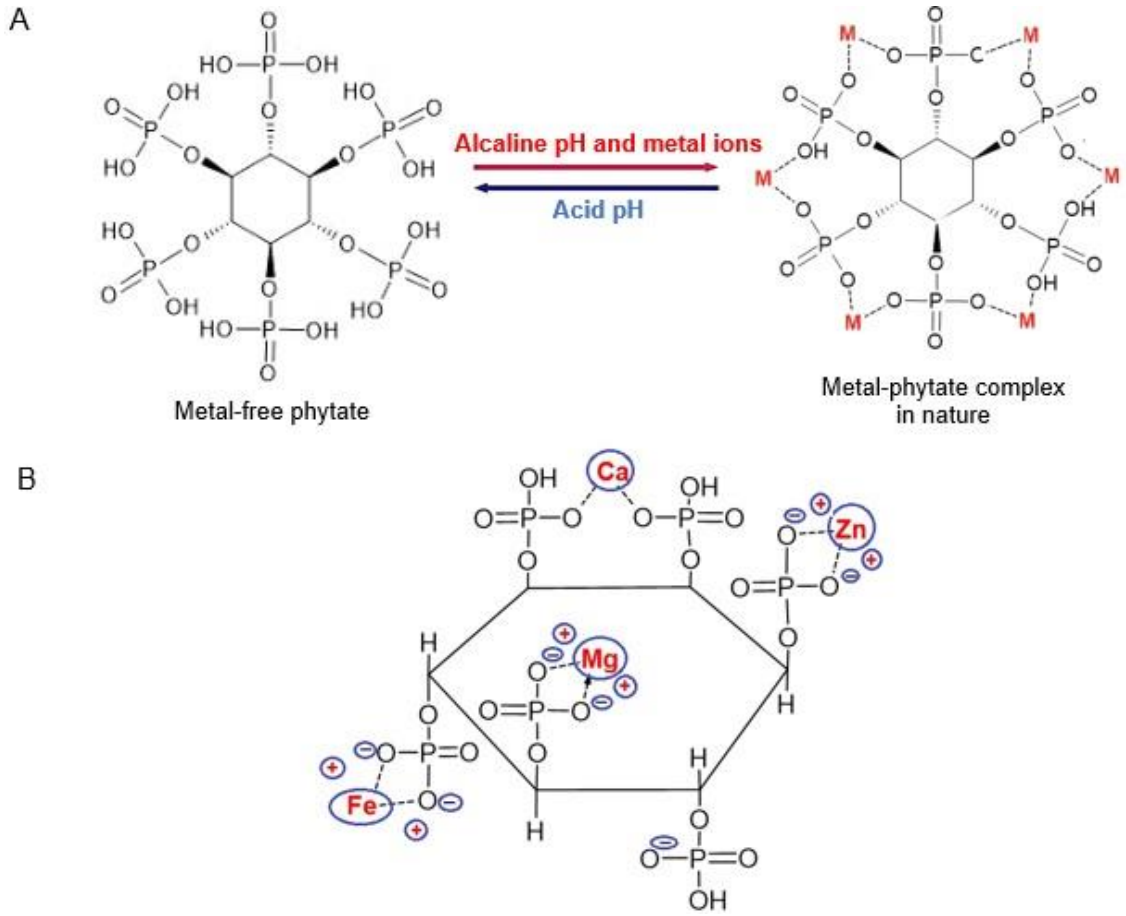


Figura 3. A y B muestran los efectos del pH y los cationes metálicos divalentes sobre la naturaleza fisiológica del fitato.

Fuente: tomado de Oh et al.[29]

2.3.3. Biodisponibilidad fitato-mineral

La absorción y disponibilidad de hierro, zinc y calcio en el cuerpo humano se puede predecir calculando las proporciones molares de fitato a mineral. La investigación indica que una relación molar de fitato a hierro (phy/Fe) superior a 1 tiene un efecto negativo sobre la absorción de hierro, en cambio una relación molar 0,4 es conveniente**.** Asimismo, una relación molar phy/Zn superior a 15 afecta la

biodisponibilidad e inferior a 5 se asocia con una absorción correspondiente al 50%. En caso del Ca una relación molar phy/Ca superior a 0,17 podría afectar su absorción y para el zinc una relación molar de fitato-calcio/Zn (mejor predictor de la absorción de zinc) superior a 200 puede afectar su biodisponibilidad[5].

2.4. Estrategias de reducción del fitato

Las estrategias comunes para reducir la carga de fitatos en alimentos son:

a) **El remojo.** Parte del fitato se solubiliza en el agua a una temperatura de 45 a 65°C y un pH de 5 a 6 por 15 a 20 minutos o tiempos más prolongados de 15 a 20 h (dependiendo del cereal) y el agua de remojo se desecha junto con parte de fitatos disueltos en él, sin embargo, con esta técnica se pierde una importante cantidad de minerales y proteínas extraíbles[30].

b) **La cocción.** Durante la cocción se elimina parte del fitato por remojo más que por cocción ya que es estable a altas temperaturas, por lo tanto, se elimina junto con el agua de cocción, cabe mencionar que esta técnica inactiva las fitasas propias del cereal durante el calentamiento prolongado[30].

c) **La germinación.** La actividad de hidrólisis del fitato aumenta significativamente para cubrir las demandas de fósforo de la nueva plántula durante la germinación, mientras más tiempo dure (6 a 10 días) hay una reducción significativa de los niveles de fitato[30].

d) **La fermentación. Durante la fermentación se** mejora la biodisponibilidad de los minerales debido a la degradación enzimática del ácido fítico donde las fitasas reducen la forma hexadecimal del ácido fítico (IP6, mioinositol 1,2,3,4,5,6 hexakisfosfato) en formas más bajas, como IP5, IP4, IP3, IP2, IP1 y mioinositol que tienen baja capacidad para unirse a minerales como el hierro, zinc y otros mejorando así su biodisponibilidad[28,31]. De la misma manera, la adición de fitasas purificadas es una técnica efectiva para hidrolizar el contenido de fitatos, pero su uso es más a nivel industrial en el procesamiento de alimentos para animales[27].

2.5. Masa madre

La masa madre resulta de mezclar harina y agua que se fermenta de manera espontánea o inducida (bacterias ácido-lácticas y/o levaduras). Se pueden agregar otros ingredientes al comienzo de la fermentación, pero no se consideran como parte de la matriz de masa madre[32].

Desde un enfoque microbiológico la masa madre debe ser tratada como un ambiente particular y estresante, que posee concentraciones variables de carbohidratos y se caracteriza por poseer un ambiente ácido, limitada disponibilidad de oxígeno y recuentos superiores de BAL (> 10^8 UFC/g) en comparación a las levaduras (< 10^7 UFC/g), lo que representa una proporción de BAL a levadura de aproximadamente 10: 1 a 100: 1[33]. El ecosistema microbiano varía de una masa madre a otra en función a la matriz, lo que determina su capacidad acidificante y leudante. La comunidad microbiana hace que la masa sea metabólicamente activa y puede reactivarse en el tiempo mediante refrescos consecutivos[34].

En la fermentación de la masa madre las proteínas y los carbohidratos de la harina sufren cambios bioquímicos debido a la acción de enzimas endógenas y microbianas[34]. Los carbohidratos fermentables se originan esencialmente del almidón por acción de enzimas endógenas la degradan liberan maltodextrinas, maltosa y glucosa dependiendo del tipo de harina[35]. Asimismo, los requerimientos de aminoácidos son proporcionados por la hidrólisis de proteínas por enzimas de origen cerealero y microbiano[36]. Las conversiones de aminoácidos contribuyen a la formación de sabor, asimismo, los aminoácidos libres pueden generar compuestos bioactivos en la matriz de masa fermentada. Las BAL son dependientes de los aminoácidos de los cereales debido a la pérdida parcial de sus propias vías de biosíntesis de aminoácidos y las levaduras requieren grandes cantidades de aminoácidos, absorbiendo todos los aminoácidos libres disponibles durante la fermentación de la masa madre[32,37].

2.5.1. Tipos de masa madre

a) Masa madre tipo 1 o espontáneos

Son masas cuyas fermentaciones se inician espontáneamente y son refrescadas cada cierto tiempo (Figura 4A). Esto implica una reinoculación cíclica repetida (5%

- 20% m/v), a mezclas recién preparadas de harina y agua, con masa que ha sido obtenida de una fermentación previa. La fermentación se realiza tradicionalmente a temperatura ambiente (20-30 °C) con un tiempo de fermentación corto a moderado (6-24 horas). Considerando a la harina como único elemento de origen no estéril y como fuente principal de inoculación. Las comunidades microbiológicas se transforman durante el tiempo de fermentación hacia una masa madre más estable, madura y activa, que generalmente se logra en una semana en caso del trigo o centeno, pero esto puede variar dependiendo del tipo de harina, inóculo natural, parámetros de proceso y otros factores[32].

b) Masa madre con cultivo iniciador o tipo 2

Cuando la fermentación producida de la masa madre resulta de la adición de un cultivo iniciador para la mezcla de harina-agua que contiene su microbiota natural, el proceso se clasifica como tipo 2 (Figura 4B). Dichos procesos de fermentación directa no requieren retroceso y son de relevancia industrial. Generalmente, se realizan en masas madre líquidas y a temperaturas más elevadas (>30° C) que las espontáneas y tienen una duración de uno a tres días. Las masas madre obtenidas se comercializan posteriormente en forma de productos semilíquidos, termotratados o secos[32].

c) Masa madre con cultivo iniciador y refrescos (mixtos) o tipo 3

La preparación de masas madre tipo 3 consiste en iniciar la masa madre con un cultivo de BAL seguido de un refresco tradicional (Figura 4C). En la práctica este tipo se hace en laboratorios para examinar la prevalencia del cultivo iniciador agregado para obtener una determinada cepa o composición microbiana en la masa madre[32].

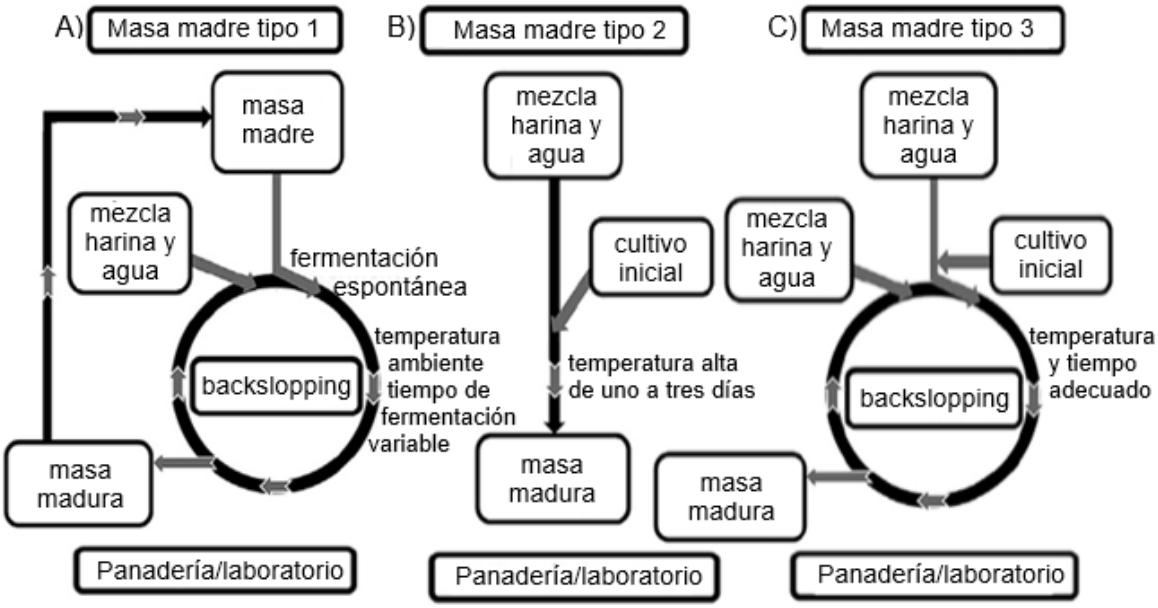


Figura 4. Tipos de masa madre según los inóculos utilizados.

Fuente: tomado de De Vuyst et al.[32]

2.6. Fitasas

Las fitasas son hexakisfosfato de mioinositol fosfohidrolasa y catalizan la hidrólisis del ácido fítico a fosfato inorgánico y derivados de fosfato de mioinositol[28,31]. La mayoría de fitasas bacterianas, fúngicas y vegetales pertenecen a las fosfatasas ácidas de histidina (HAP), enzimas que muestran una amplia especificidad de sustrato e hidrolizan el fitato libre de metales en un rango de pH ácido produciendo monofosfato de inositol al final de la reacción (figura 5)[29].

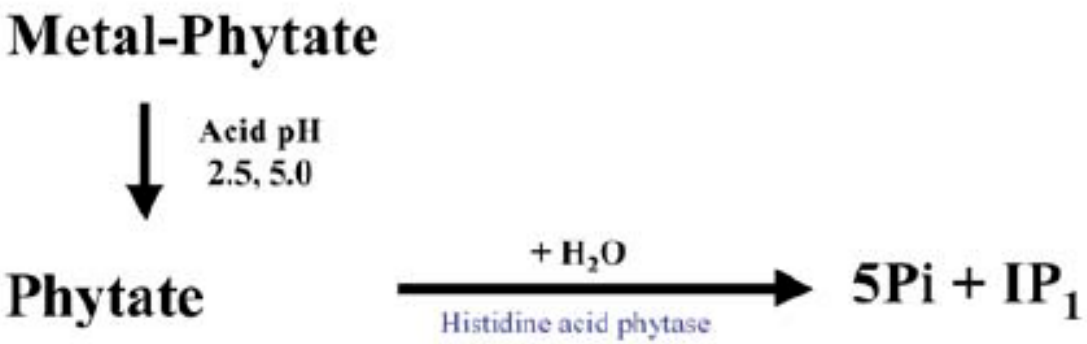


Figura 5. Representación esquemática de la hidrolización de fitatos por fosfatasas ácidas de histidina.
Fuente: tomado de Oh et al.[29]

2.6.1. Clasificación de las fitasas

Las fitasas se pueden clasificar según la estereoespecificidad para hidrolizar el fitato (número de carbonos en el anillo de mioinositol del fitato en el que se inicia la desfosforilación), el pH óptimo (fitasas alcalinas o ácidas) y su mecanismo catalítico[8]**.**

a. Según la estereoespecificidad se clasifican en 3-fitasas (EC 3.1.3.8 y 6- fitasas (EC 3.1.3.26), según la posición del primer fosfato hidrolizado. Las 3-fitasas inician la desfosforilación en la posición 3 del ácido fítico, y son el grupo más grande de fitasas, se encuentran generalmente en bacterias y hongos. Mientras que las fitasas vegetales son 6-fitasas y actúan preferentemente en el carbono C6[28,31].

b. Basado en el pH óptimo, las fitasas ácidas actúan a pH comprendidos entre 3,0 y 5,5, y las fitasas alcalinas actúan a pH alrededor de 8 [38,39].

c. Según su propiedad catalítica se clasifican como fosfatasas ácidas de histidina (HAP), fosfatasas de hélice β (BPP), fosfatasas de cisteína (CP) y fosfatasas ácidas púrpuras (PAP)[8]. Las 3-fitasas son estructuralmente homólogas con las fosfatasas ácidas de histidina (HAP) y pueden iniciar la hidrólisis del ácido fítico en la posición C3 o C6 del anillo de inositol produciendo Myo-monofosfato de inositol como resultado final (figura 6)[28,31]. La figura 7 muestra las vías de degradación del fitato en algunas fitasas de levadura[28].

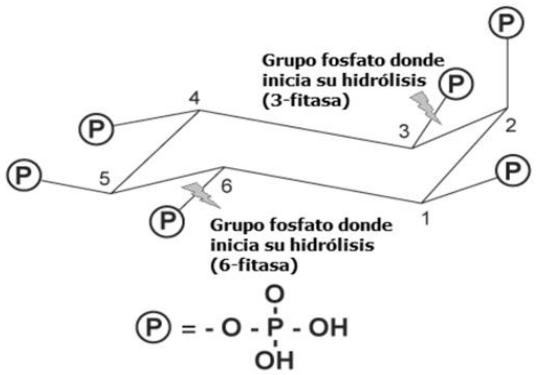


Figura 6. Colocación del inicio de hidrólisis de 3 y 6-fitasas.
Fuente: tomado de Acosta y Cárdenas[40].

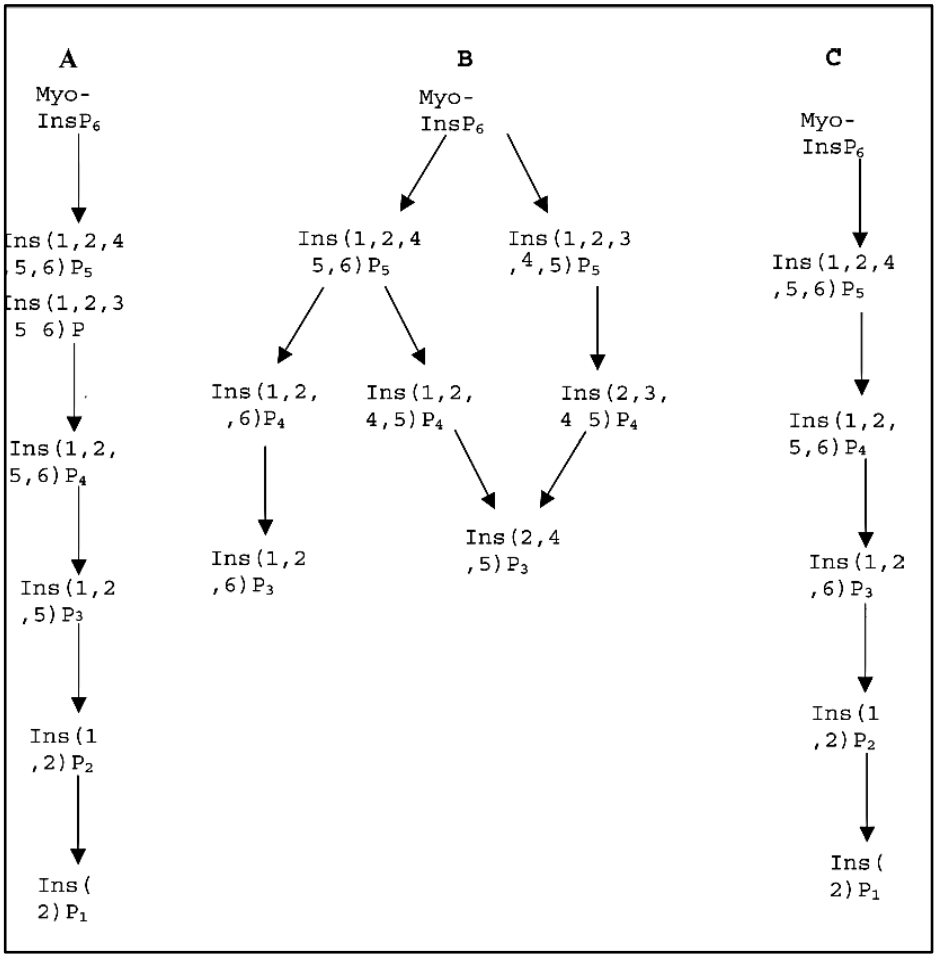


Figura 7. Vías de desfosforilación de IP6 catalizadas por las fitasas de *Candida krusei* (A), *Pichia rhodanensis* (B) y *Saccharomyces cerevisiae* (C).

Fuente: tomado de Kaur et al.[41]

2.7. Microorganismos productores de fitasas

Las fitasas se localizan comúnmente en la naturaleza y se pueden obtener de varias fuentes, incluidas plantas, animales y microorganismos, pero el uso de fitasas microbianas es más aplicado debido a su viabilidad económica, mayores rendimientos, estabilidad y mayor actividad catalítica[42].

Los hongos y levaduras son reconocidos como los mayores productores de fitasa en comparación con bacterias y plantas, ya que producen fitasa extracelular que actúa en amplios rangos de pH y temperatura. Los hongos notificados como productores de fitasa incluyen *Rhizomucor pusillus*, *Aspergillus ficuum*, *Penicillium oxalicum*, *Thermomyces lanuginosus* y *Aspergillus niger,* este último produce una

fitasa reconocida como segura (GRAS) para su uso en el procesamiento de alimentos por la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU.[8]
Las levaduras con actividad fitasa se presentan en la siguiente tabla 6.

Tabla 6. Especies de levaduras productoras de fitasas

Levadura	Localización	Referencia
Arxula adeninivorans	Extracelular	Sano *et al*., 1999
Candida spp.	Extracelular	Nakamura *et al*. 2000
Candida krusei	Ligado a célula	Quan *et al*., 2001
Cryotococcus sp.	Extracelular	Greenwood and Lewis, 1997
Kluyveromyces lactis	Extracelular	Nakamura *et al*., 2000
Pichia anomala	Extracelular	Nakamura *et al*., 2000
Pichia anomala	Ligado a la célula	Vohra and Satyanarayana, 2001
Pichia rhodanensis	Extracelular	Nakamura *et al*., 2000
Pichia spartinae	Extracelular	Nakamura *et al*., 2000
Rhodotorula gracilis	Ligado a la célula	Bindu *et al*., 1998
Saccharomyces cerevisiae	Ligado a la célula	Howson and Davis, 1983
Saccharomyces cerevisiae	Extracelular	Nayini and Markakis, 1984
Saccharomyces kluyveri	Extracelular	Nakamura *et al*., 2000
Schwanniomyces occidentalis	Extracelular	Segueilha *et al*., 1992
Saccharomyces castellii	Ligado a la célula	Lambrecht *et al.*, 1992
Torulaspora delbrueckii	Extracelular	Nakamura *et al*., 2000

Fuente: tomado de Kaur et al.[41]

2.7.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es un organismo unicelular eucariota, asexual y ubicuo que pertenece al reino Fungi, su forma suele ser esférica, ovalada o cilíndrica con un diámetro de alrededor 8 µm. Asimismo, estas células contienen una pared celular de doble capa a través de la cual absorbe nutrientes y libera metabolitos. Se caracterizan por ser anaerobias facultativas, en presencia de oxígeno convierten los azúcares en dióxido de carbono, energía y biomasa, y en ausencia de este utilizan la fermentación alcohólica para transformar el azúcar en dióxido de carbono y etanol[43].

Saccharomyces cerevisiae cepa panadera cuenta con preparaciones comerciales que contienen una o más cepas de esta especie. Estas cepas deben cumplir requisitos específicos para su aplicación como la producción adecuada de gas y

tolerancia a un amplio rango de pH, temperatura y concentración de sal y azúcar, así como la formación de compuestos aromáticos deseables. Estas levaduras comerciales se diferencian de las "cepas silvestres" debido a su modificación y adaptación genética, que les permite crecer en situaciones inapropiadas. Se comercializan frescas y granuladas liofilizadas instantáneas[43].

Diferentes estudios has demostrado que diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* son productoras de fitasas en menor o mayor grado, lo cual es inherente a cada cepa [44,45].

2.7.1 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL son un grupo de bacterias que producen ácido láctico como metabolito principal o único producto de fermentación. Son Grampositivos, no forman esporas, no móviles y catalasa negativos; pueden ser cocos, cocobacilos y bacilos de longitud variable. Son anaerobios facultativos y en medios de cultivo sólidos forman colonias en presencia del aire. Se clasifican en homofermentativas (producen solo ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico y otras sustancias) de acuerdo con la fermentación de la lactosa. Incluyen los géneros *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc y Enterococcus*[46].

Las masas madre estabilizadas contienen mayormente BAL heterofermentativas, particularmente del género *Lactobacillus* y más de 90 especies fueron aisladas a partir de ellas, incluyendo especies obligadas y facultativamente heterofermentativas, así como algunas obligadamente homofermentativas[47].

Diferentes estudios han evidenciado que existen BAL nativas aisladas de de cereales productoras fitasas, entre ellas destacan cepas *Lactobacillus plantarum, Entorococcus mundtii*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *Leuconostoc mesenteroides* y *L. rhamnosus*[48]*.* Asimismo, los estudios han mostrado que las BAL producen fitasas intra y extracelulares[49]. Complementario a ello Parada et al.[50] encontraron que las fitasas extracelulares de BAL presentan un pH óptimo entre 5,5 y 7,0 e indicaron que pH inferiores a 4,5 disminuyen y cantidades inferiores a 4,0 la actividad fitasa es insignificante. Por último, Reale et al.[51] indicaron que la participación de BAL en la reducción de fitatos es básicamente proporcionar pH óptimos para la activación de fitasas endógenas y exógenas (levaduras).

2.8. Definición de términos

Cepas: conjunto de descendientes genéticamente similares o de una única colonia o célula[52].

Actividad fitasa: definido como el número de enzimas que libera un microgramo de fosfato inorgánico por mililitros en el tiempo de un minuto en las circunstancias presentes[53].

Enzimas: son proteínas que catalizan o aceleran una variedad de reacciones químicas en el organismo[54].

Levaduras: son hongos unicelulares con gran diversidad de tamaño forma y color[55].

Bacterias heterofermentativas: son bacterias con capacidad de generar no solo ácido láctico, sino también una cantidad apreciable de etanol, acetato y CO_2[58].

Bacterias homofermentativas: son bacterias que tienen la capacidad de sintetizar ácido láctico sin libera CO_2 en la fermentación[56].

Anamorfo: estado reproductivo asexual de hongos ascomicetos y basidiomicetos[57].

Esporas: son estructuras metabólicamente inactivas que se producen mediante esporulación para prevalecer sobre condiciones climáticas duras y desfavorables de inanición y estrés[58].

Halos: efecto de ausencia de color alrededor de las colonias de microorganismos que corresponden a un área de degradación[59].

Colonias: se define como una masa visible de microorganismos que se originan a partir de una célula madre[60].

Biodisponibilidad: proporción de un nutriente presente en un alimento, que es digerido, absorbido y utilizado por el organismo[61].

Saponinas: son sustancias que se encuentran en las plantas, particularmente de la familia de las leguminosas, son glucósidos triterpenoides sin una fórmula química bien definida y que les dan sabor amargo a las semillas de quinua[4].

Crioconservación: es una técnica basada en el proceso de preservación de células, tejidos, órganos o cualquier material biológico a -196 °C en nitrógeno líquido para mantener su viabilidad[62].

Refrescos de masa: proceso de desechar una cantidad determinada de cultivo anterior y de agregar agua y harina fresca[63].

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1. Hipótesis

Existe reducción de fitatos en masas madre de harinas de quinua negra Collana y amarilla Kancolla durante la fermentación espontánea e inducida con *Saccharomyces cerevisiae* comercial.

3.2. Variables

Variable dependiente: contenido de fitatos en masas madre de harina de quinua.

Variable independiente: tiempo de fermentación espontánea e inducida con *Saccharomyces cerevisiae* comercial.

3.3. Operacionalización de variables

Tabla 7. Operacionalización de variables

VARIABLE (S)	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA	OBSERVACIONES
Contenido de fitatos en masa de harinas de quinua fermentadas	Dependiente cuantitativa	El ácido fítico es una molécula denominada inositol formada por seis carbonos y ubicado en cada carbono una molécula de ortofosfato. Los grupos fosfatos se cargan negativamente a pH neutro por lo que interactúan de forma más fácil con moléculas que poseen carga positiva como son las sales minerales mono, di y trivalentes[8].	El contenido de fitato en masas fermentadas de harinas de quinua negra y amarilla cuantificado mediante el índice de fitatos residual expresado en mg/L.	Contenido de fitatos antes y después de la fermentación en masas de harinas de quinua negra y amarilla.	Fitatos en masas sin fermentar y harinas Fitato residual	mg/L	Ninguna
Tiempo de fermentación espontánea e inducida	Independiente cualitativa	La fermentación de alimentos son procesos metabólicos donde intervienen una gama de microorganismos, procesos enzimáticos e ingredientes donde se obtiene un producto final con mejoras del sabor, textura, enriquecimiento nutricional, eliminación de antinutrientes y producción de sustancias implicadas en la promoción de la salud[64].	El proceso de fermentación que implica encontrar el tiempo de fermentación para obtener una masa madre madura con condiciones para una degradación efectiva del fitato.	Características organolépticas Características fisicoquímicas	Olor, color, sabor y volumen pH, sólidos solubles y % acidez		Ninguna

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Consideraciones éticas

Los reactivos usados se han manejado de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, asimismo, las cepas utilizadas se han sido previamente autoclavados antes de la eliminación respetando el medio ambiente y al personal que labora en el área.

4.2. Área de estudio

Laboratorios de Microbiología y Biotecnología del Departamento Académico de Microbiología y Parasitología Básica y Aplicada presente en la Facultad de Farmacia y Bioquímica en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Coordenadas en grados decimales (GD):

- Distrito: Cercado de Lima
- Provincia: Lima
- Departamento: Lima
- Latitud: -12.0561741
- Longitud: -77.0233785

4.3. Diseño de investigación

La investigación es de tipo básica, enfoque cuantitativo, diseño cuasiexperimental y corte transversal.

- **El tipo de investigación básica**: ya que se intenta obtener información del tiempo en que se forma la masa madre donde haya mayor reducción de fitatos.
- **El enfoque cuantitativo**: porque se cuantifica el contenido de fitatos (variable dependiente) a través del tiempo.
- **El diseño cuasiexperimental**: ya que se manipula una sola variable, tiempo de fermentación.
- **Corte transversal**: los resultados de la investigación se obtuvieron en un periodo de tiempo determinado.

4.4. Muestra

Harinas y masas de madre de quinua negra y amarilla antes y después de ser fermentadas.

4.5. Métodos

4.5.1. Determinación de características organolépticos y fisicoquímicos durante la fermentación espontánea e inducida (*Saccharomyces cerevisiae* comercial) de masas madre de harina de quinua negra y amarilla

4.5.1.1. Obtención de los granos de quinua

Los granos de quinua negra (INIA 420 Negra Collana) y amarilla (Kancolla-INIA) fueron proporcionados por INIA (Instituto Nacional de Investigación Agraria) de Puno, las cuales fueron transportadas a temperatura ambiente por vía terrestre hasta los laboratorios de Microbiología y Bromatología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. La clasificación taxonómica de las variedades de quinua usadas se encuentran el Anexo 1.

4.5.1.2. Obtención y caracterización fisicoquímica de harinas de quinua

a) Obtención de la harina

Para la obtención de harina de quinua se tuvo en cuenta algunos procesos detallados por Pantoja et al.[65] Los granos de quinua fueron seleccionados y clasificados separando los granos buenos de los dañados, las piedras y diversos contaminantes físicos. Posteriormente, la desaponificación se realizó mediante lavado manual a temperatura ambiente por 40 minutos hasta que ya no hubo formación de espuma. Seguidamente, se realizó el secado en una estufa estática (MEMMERT) por 24 h a 50°C. Luego, se realizó la molienda con una licuadora (Bosch) a velocidad máxima durante 5 min, esto fue tamizado a partículas finas 0,5 mm mediante un tamiz número 35[66]. Finalmente, la harina fina obtenida se almacenó en bolsas estériles hasta su utilización, a una temperatura de 4°C[67].

b) La caracterización fisicoquímica de harinas

pH. Se realizó de acuerdo con el método AOAC 943.02[68]. Se pesó 10 g de muestra de harina, se agregó 100 mL de agua destilada, se agitó y dejó sedimentar por 10 minutos, se tomó 25 mL y midió el pH con el potenciómetro (SI Analytics) previamente calibrado con Buffer pH 4 y 7.

Porcentaje de acidez. Se determinó por volumetría[69]. Se pesó 10 g de muestra y se diluyó en 100 mL de agua destilada, se agitó unos minutos, se filtró y tomó un volumen de 50 mL, se añadió 1 mL de fenolftaleína y se tituló con hidróxido de sodio

0,1 N. Los resultados fueron expresados en porcentaje referido al ácido sulfúrico y calculada en base al 15 % de humedad.

El contenido de sólidos solubles. Se realizó de acuerdo con el método de Meza[70], donde se pesó 10 g de muestra que se diluyó en 50 mL de agua destilada, se agitó 1 min y se dejó sedimentar por 10 minutos, se extrajo una alícuota y se leyó en refractómetro digital (Kyntel).

Contenido de humedad. se realizó mediante la norma AOAC 925.10[71], basada en la determinación gravimétrica por pérdida de peso. Las placas Petri se secaron en la estufa por 30 minutos a 110°C, se dejó enfriar en el desecador, luego se pesó en balanza analítica (Sartoriu CPA2245), se anotó el valor, se taró y se colocó 5g de muestra, esto se llevó nuevamente a la estufa a 110°C por 30 minutos, se retiró la muestra al desecador, se enfrió 30 minutos y se anotó el pesó nuevamente, este proceso se realizó cada 30 minutos hasta obtener peso constante. Se realizaron los cálculos utilizando la siguiente fórmula:

$$\%\ de\ humedad = \frac{P1 - P2}{peso\ de\ la\ muestra}\ x\ 100$$

Donde:

P1: Peso de la muestra inicial + placa

P2: Peso de la muestra final + placa

Contenido ácido fítico. Se determinó por colorimetría de acuerdo con las indicaciones que se detallan en la sección 4.5.3.2.

4.5.1.3. Caracterización organoléptica y fisicoquímica durante la fermentación de las masas de harina de quinua

a) Obtención de la masa madre

Las masas madre fueron preparadas siguiendo la metodología de Falciano et al.[34] con algunas modificaciones. Las fermentaciones espontáneas e inducidas tipo masa madre se realizaron a temperatura ambiente de 27-30°C durante 168 h, con refrescos sucesivos cada 24h. Se prepararon 4 masas: 2 de fermentación espontánea: fermentación espontánea de quinua negra (FEQN) y fermentación espontánea de quinua amarilla (FEQA); 2 para fermentación inducida etiquetadas como FIQN y FIQA. En el Anexo 2 se indican las cantidades y el proceso de

elaboración de estas masas. Para la fermentación inducida se inoculó levadura seca de panadería (Mauripan) 0,5 % p/p. Los análisis organolépticos, fisicoquímicos y refrescos de masa se realizaron cada 24 h, para los refrescos de masa se sacaron el 25% del total de las masas que fueron reemplazadas por harina y agua en igual proporción.

b) Caracterización organoléptica de las masas madre

Las características organolépticas fueron evaluadas por observación y degustación directa, se anotaron características como el olor, sabor, color y volumen de las masas después de 24 horas de fermentación[63].

c) Caracterización fisicoquímica de las masas madre

pH y contenido de sólidos solubles. Se realizaron siguiendo los mismos pasos que para la harina.

La acidez titulable. Se utilizó 10g de muestra y se diluyó con 100 mL de agua destilada, se agitó, filtró y se extrajo una alícuota de 25 mL, se agregó 3 gotas del indicador fenolftaleína y se tituló con NaOH al 0,1 N. Por último, se anotó el gasto para calcular el % de acidez titulable expresado en ácido láctico utilizando la siguiente fórmula[72]:

$$\%\,Ácido\ láctico = \frac{gasto\ x\ Nx\ Fe}{peso\ de\ la\ muestra}\ x\ 100$$

Donde:

N: normalidad de la solución del hidróxido de sodio 0,1N

Fe: equivalente de ácido láctico

4.5.2. Identificación de levaduras y BAL con actividad fitasa durante la fermentación espontánea de masas madre de harina de quinua negra Collana y amarilla Kancolla

4.5.2.1. Aislamiento

Para el aislamiento de levaduras y BAL se tomó 1 g de masa de la FEQN y FEQA de 24, 72 y 168 h de fermentación, se colocaron en bolsas esterilizadas con 9 mL de solución salina estéril (SSE) 0,9 % p/v y fueron homogeneizadas por 1,5 min, a partir de esta mezcla se realizaron las diluciones seriadas (hasta 10^{-6})[48].

4.5.2.2. Aislamiento de levaduras (*Saccharomyces* y No-*Saccharomyces*)

A partir de las diluciones seriadas 10^{-4}, 10^{-5} y 10^{-6} de las masas de la FEQN y FEQA de 24, 72 y 168 h fueron sembradas por la técnica de agotamiento por estriado en Agar Sabouraud (suplementado con 200 mg/L de gentamicina) y se colocaron en incubadora (KIVI XMTD) a 30°C por 72h. Las colonias fueron caracterizadas macroscópicamente (tamaño, forma, color, borde y brillo) y luego microscópicamente (tamaño de células y tipo de reproducción) después de la tinción con azul de metileno[73]. Posteriormente se realizaron subcultivos sucesivos hasta obtener cultivos puros de las colonias seleccionadas, se codificaron y conservaron por crioconservación a -20°C hasta su posterior análisis[74].

4.5.2.3. Aislamiento de bacterias ácido – lácticas (BAL)

A partir de las diluciones 10^{-4} a 10^{-6} de las masas de la FEQN y FEQA de 24, 72 y 168 h se tomaron 100 µL de cada muestra y se sembraron por incorporación en agar MRS (suplementado con 75 mg /L de fluconazol), estas fueron incubadas por anaerobiosis a 30°C por 48 h. Posteriormente, se caracterizaron las colonias macroscópicamente (tamaño, forma, color, borde y brillo) y microscópicamente (forma de células y tipo de reproducción) previa tinción Gram, además se realizó la prueba de la catalasa. Se seleccionaron aquellas bacterias Gram positivas, con morfología cocoide o bacilar y catalasa negativas[75]. Posteriormente se realizaron subcultivos sucesivos en agar MRS hasta conseguir cultivos puros[48]. Cada colonia fue codificada y conservada por crioconservación a - 20°C para su posterior análisis[74].

4.5.2.4. Selección de levaduras y BAL con actividad fitasa en agar MDF

Las colonias seleccionadas fueron sembradas en agar MDF (Medio de detección de fitasas). El medio fue previamente preparado mezclando (g/L): agar 20, dextrosa 20, triptona 10, NaCl 5, KCl 0,1, se ajustó el pH a 8 y luego fue esterilizado a 121°C por 15 minutos, se enfrió a 50°C y se mezcló con 5 g/L de fitato de calcio estéril[76]. Para la siembra, las cepas obtenidas fueron previamente activadas en sus respectivos medios, BAL en agar MRS a 30°C por 24h y levaduras en agar Sabouraud a 30°C por 72 h. Las colonias activadas de cada cepa fueron sembradas por duplicado en agar MDF por hisopado directo. La incubación se realizó a 30°C por 24 h para BAL y 72 h para levaduras[31]. Después, se midió el diámetro de los

halos formados por la hidrólisis del fitato, donde las colonias con un halo mayor 15 mm fueron seleccionadas como cepas con actividad fitasa[9].

4.5.2.5. Identificación de levaduras y BAL con actividad fitasa

a) Identificación levaduras

Las cepas de levaduras que dieron positivo al MDF se activaron en agar Sabouraud a 30°C por 72 h. Luego se preparó una suspensión con cada cepa con 5mL de SSE a una DO de 2, se tomaron 100 µL de esta suspensión y se mezclaron con el solubilizante API 20 AUX para Saccharomyces, se tomaron 200µL de esta mezcla y se sembraron en cada pocillo de la galería, luego se incubaron a 30°C por 48 y 72 h. En cada tiempo se observó y anotó la formación de precipitado, además se observó la formación de pseudohifas en fresco con microscopio. Los datos se anotaron en la hoja de resultados del sistema API el cual proporcionó códigos que se introdujeron al software API web que reveló la identidad de las cepas a nivel de especie. En caso de levaduras tipo No-*Saccharomyces* se realizó el mismo procedimiento, pero el sistema de identificación fue API 32C Biomerieux[77].

b) Identificación de BAL

Las cepas de BAL positivas al MDF se activaron en agar MRS a 30°C por 24 h, luego se preparó una suspensión de cada cepa con 5mL de SSE a una DO de 2, se utilizó 100 µL de esta suspensión que se mezclaron con el solubilizante del sistema API® 50 CHL, se tomó 150µL de esta mezcla para ser sembradas en cada pocillo y se incubaron a 37°C por 24 y 48 h. En cada tiempo se anotaron los cambios de coloración (+) en la hoja de resultados, los códigos obtenidos se introdujeron al software API web que reveló la identidad de las cepas[78].

4.5.3. Cuantificación de fitatos durante la fermentación espontánea e inducida *Saccharomyces cerevisiae* comercial de masas madre de harina de quinua negra y amarilla

4.5.3.1. Preparación de reactivos y muestras

Las soluciones estándares se prepararon a partir de una solución madre de fitato de sodio (320 mg/L), las concentraciones de los estándares fueron 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 25, 50 y 100 mg/L[79]. Asimismo, el reactivo de color Wade se preparó disolviendo 300 mg de ácido sulfosalicílico y 30 mg de $FeCl_3$ hexahidratado en 100 mL de agua

desionizada, esto fue conservado de 2- 4 °C en envase ámbar[80]. Por otro lado, **l**as muestras de masas fermentadas muestreadas cada 24h fueron secadas en la estufa a 50°C hasta obtener 5% de humedad, luego se molieron y se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su análisis[10].

4.5.3.2. Determinación fitato residual por colorimetría

Para determinar el fitato presente en las muestras de masas fermentadas y el control (masa en tiempo 0) se preparó una mezcla con 0,5 g de muestra de masa madre seca con HCl 2,4% a 10 mL, se agitó 16 h a 220 rpm en un agitador orbital (Biobase). Después fueron centrifugadas a 3500 rpm a 10°C por 20 min y se tomaron los sobrenadantes (S-1), a estos se les añadieron 1g de NaCl y fueron agitados a 220 rpm por 20 min hasta la disolución de la sal, posteriormente se dejó sedimentar a una temperatura de -20°C por 20 min, se centrifugaron a 3500 rpm a 10°C por 20 min y se recogieron los sobrenadantes (S-2). Luego se realizó una dilución 1/25 del S-2 en agua destilada desionizada, seguidamente se realizó la mezcla de 3 mL de la dilución con 1 mL del reactivo de Wade y se centrifugaron a 3500 rpm a 10° C por 10 min, inmediatamente después se midió la absorbancia a 500 nm de 2 mL de esta mezcla y el blanco (mezcla de 3 mL de agua destilada desionizada con 1 mL del reactivo de Wade) en espectrofotómetro marca Thermoscientific Genesys 150. Los resultados fueron comparados con una curva estándar que presentaba diferentes concentraciones de fitato de sodio (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 25, 50 y 100 mg/mL). Finalmente, la concentración de fitato fue calculada por diferencia entre la absorbancia del blanco y las muestras ensayadas[81].

4.6. Análisis estadístico

Los análisis de la presente investigación fueron realizados de forma triplicada y los resultados se reportaron mediante el promedio de las repeticiones ejecutadas ± la desviación estándar, por lo que se realizó el análisis de varianza ANOVA y la prueba estadística de Tukey con un porcentaje de confianza de 95% utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion XIX.

V. RESULTADOS

5.1. Determinación de las características organolépticas y fisicoquímicas de las masas madre fermentadas de harina de quinua negra y amarilla.

La tabla 8 muestra que, el pH de la harina de quinua amarilla es ligeramente mayor (6,53±0,02) que la quinua negra (6,43±0,03); la acidez titulable es mayor en la harina de quinua negra; no existe diferencia significativa en los valores de humedad entre ambas variedades y en contenido de fitatos, la harina de quinua negra (1,86±0,08% (p/p) tiene mayor cantidad que la amarilla (1, 51±0,04 % (p/p).

Tabla 8. Características fisicoquímicas de harinas de quinua negra y amarilla

Características fisicoquímicas	Harina de quinua negra	Harina de quinua amarilla
pH	6,43±0,03[b]	6,53±0,02[a]
Acidez titulable (%)	0,19±0,01[a]	0,14±0,00[b]
°Brix	5,33±0,06[a]	4,90±0,10[b]
Humedad (%)	11,44±0,77[a]	12,04±0,67[a]
Fitatos (%)	1,86±0,08[a]	1,51±0,04[b]

Los datos mostrados representan el promedio (n=3) ± DS. Los superíndices (a,b) en una columna indica la diferencia significativa ((p<0.05) en los valores de las harinas de las dos variedades de quinua.

La tabla 9 muestra que, en la fermentación espontánea de masas de harina de quinua negra y amarilla (FEQN y FEQA) las características típicas de masa madre se evidencian a partir de la 48h donde presentan olor láctico (+++), sabor ácido (+++) y volúmenes notables (750-850mL), en comparación con la fermentación inducida (FIQN y FIQA) que adquirió estas características a partir de las 72h. En la fermentación espontánea, las características típicas de masa madre se mantuvieron hasta las 96h y luego decayeron levemente, en cambio, en la fermentación inducida se mantuvieron estables hasta el final de la fermentación(168h).

Tabla 9. Características organolépticas de masas madre durante el tiempo de fermentación espontánea e inducida de quinua negra y amarilla (FEQA, FEQN, FIQA y FIQN)

Tipos de fermentación	Características organolépticas	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
FEQA	OLOR	sui géneris	láctico +	láctico +++ alcohólico +	láctico +++ alcohólico +	láctico +++ alcohólico +	láctico ++ alcohólico +	láctico ++ alcohólico +	láctico ++ alcohólico +
	SABOR	sui géneris	ácido +	ácido +++	ácido +++	ácido +++	ácido ++	ácido ++	ácido ++
	COLOR	crema	crema	crema claro	crema claro	crema claro	crema claro	crema	crema
	VOLUMEN	450 mL	500 mL	750 mL	750 mL	800 mL	750 mL	650 mL	650 mL
FEQN	OLOR	sui géneris	láctico +	láctico +++ alcohólico ++	láctico ++ alcohólico ++	láctico +++ alcohólico ++	láctico ++ alcohólico ++	láctico ++ alcohólico +	láctico ++ alcohólico +
	SABOR	Sui géneris	ácido +	ácido +++	ácido +++	ácido +++	ácido ++	ácido ++	ácido ++
	COLOR	negro	Negro	Negro claro	Negro claro	Negro claro	Negro claro	Negro	Negro
	VOLUMEN	450 mL	470 mL	750 mL	800 mL	850 mL	700 mL	700 mL	650 mL
FIQA	OLOR	sui géneris	láctico + alcohólico +++	láctico + alcohólico +++	láctico +++ alcohólico ++	láctico +++ alcohólico +	láctico +++ alcohólico +	láctico +++ alcohólico +	láctico +++ alcohólico +
	SABOR	sui géneris	sui géneris	ácido +	ácido +++	ácido +++	ácido +++	ácido +++	ácido +++
	COLOR	crema	crema	Crema	crema claro	crema claro	crema claro	crema claro	crema claro
	VOLUMEN	450 mL	650 mL	750 mL	850 mL	800 mL	800 mL	800 mL	750mL
FIQN	OLOR	sui géneris	láctico + alcohólico +++	láctico + alcohólico +++	láctico +++ alcohólico ++	láctico +++ alcohólico ++	láctico +++ alcohólico ++	láctico +++ alcohólico ++	láctico +++ alcohólico ++
	SABOR	sui géneris	sui géneris	ácido +	ácido +++	ácido +++	ácido +++	ácido +++	ácido +++
	COLOR	negro	Negro	Negro	Negro claro	Negro claro	Negro claro	Negro claro	Negro claro
	VOLUMEN	450 mL	700 mL	800 mL	850 mL	850 mL	800 mL	780 mL	750 mL

+: leve, ++: moderado, +++: fuerte; FE: fermentación espontánea, FI: fermentación inducida, QN: quinua negra, QA: quinua amarilla

La figura 8 muestra que, en la fermentación espontanea de la masa de harina de quinua negra, el descenso de pH es significativo entre las 24 y 48h (de 6,38 a 5,18), llegando hasta 4,96 a las 72 h; mientras tanto, en la fermentación inducida de la masa, el descenso significativo se da a partir de las 48 hasta las 96 h (de 6,06 a 4,77), lo cual se mantiene hasta el final del ensayo. El descenso de pH es mucho más rápido en la fermentación espontánea (24 a 48h), sin embargo, el mayor descenso se da en fermentación inducida (4,62) frente a la espontánea (4,93) al final de la fermentación.

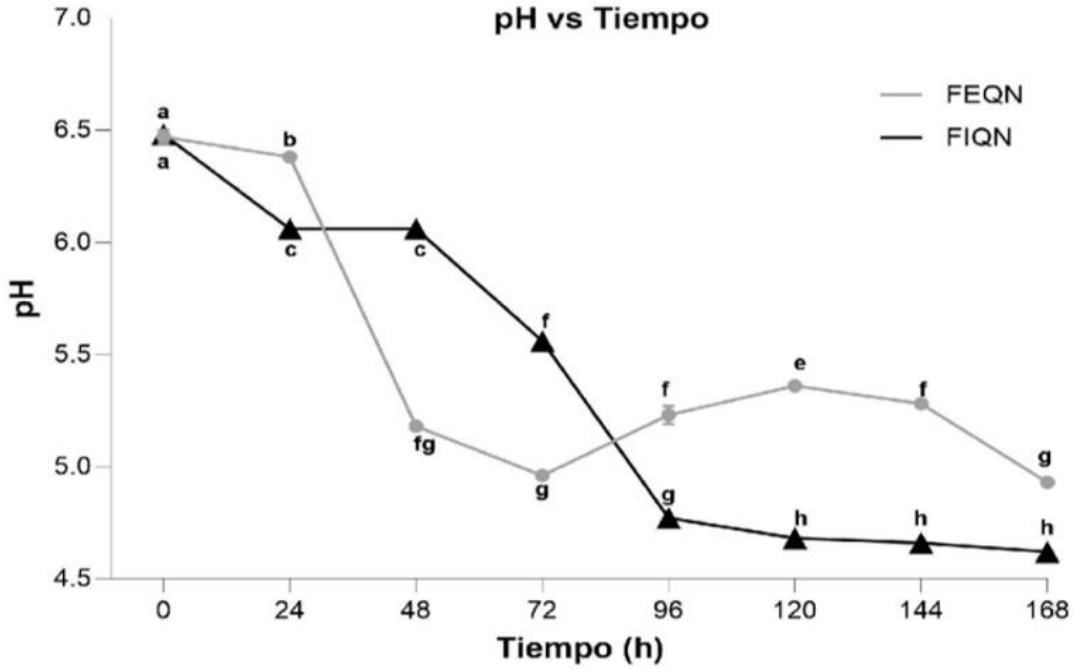


Figura 8. Variación del pH de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua negra (FEQN y FIQN).

La figura 9 muestra que, en la fermentación espontanea de la masa de harina de quinua amarilla, el descenso de pH es significativo entre las 24 y 48h (de 6,48 a 5,65), llegando hasta 4,48 a las 72 h; mientras tanto, en la fermentación inducida de la masa, el descenso significativo se da a partir de las 48 hasta las 96 h (de 6,07 a 4,85), lo cual se mantiene hasta el final del ensayo. El descenso de pH es mucho más rápido en la fermentación espontánea (24 a 48h), sin embargo, el mayor descenso se da en fermentación inducida (4,66) frente a la espontánea (5,20) al final de la fermentación.

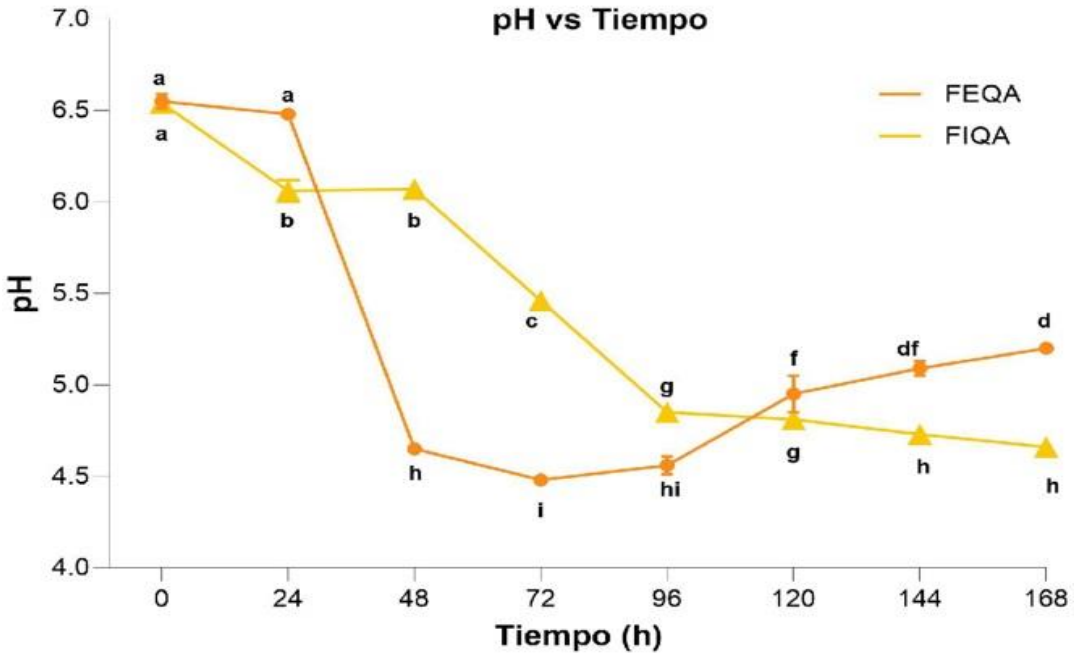


Figura 9. Variación del pH de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua amarilla (FEQA y FIQA).

Los valores de la tabla 10 muestran que, los pH más bajos durante la fermentación espontánea de masas de quinua negra y amarilla se obtuvieron a las 72h donde la quinua amarilla obtuvo el valor más bajo (4,48) frente a la negra (4,96). En cambio, durante la fermentación inducida, los pH más bajos obtuvieron al final de la fermentación (4,62 - 4,66) sin diferencia estadística entre ambas variedades.

Tabla 10. Variación del pH de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua negra y amarilla (FEQN, FEQA, FIQN y FIQA)

Tiempo (h)	FEQN	FEQA	FIQN	FIQA
0	6,47 ± 0,03^{a}	6,55 ± 0.04^{a}	6,48 ± 0,03^{a}	6,54 ± 0,02^{a}
24	6,38 ± 0,01^{b}	6,48 ± 0.03^{a}	6,06 ± 0,02^{c}	6,06 ± 0,06^{c}
48	5,18 ± 0,02^{g}	4,65 ± 0.02^{j}	6,06 ± 0,02^{c}	6,07 ± 0,02^{c}
72	4,96 ± 0,02^{h}	4,48 ± 0.03^{l}	5,56 ± 0,02^{d}	5,46 ± 0,01^{e}
96	5,23 ± 0,04^{g}	4,56 ± 0.05^{k}	4,77 ± 0,02^{i}	4,85 ± 0,02^{i}
120	5,36 ± 0,01^{f}	4,95 ± 0.10^{h}	4,68 ± 0,02^{j}	4,81 ± 0,02^{i}
144	5,28 ± 0,01^{g}	5,09 ± 0,04^{h}	4,66 ± 0,02^{j}	4,73 ± 0,01^{i}

168	4,93 ± 0,02^{h}	5,2 ± 0,03^{g}	4,62 ± 0,04^{j}	4,66 ± 0,01^{j}

Los datos mostrados representan el promedio (n=3) ± DS. Las letras diferentes de los superíndices en las columnas y las filas indican diferencias significativas($p<0.05$). FE: fermentación espontánea, FI: fermentación inducida, QN: quinua negra, QA: quinua amarilla

La figura 10 muestra que, en la fermentación espontanea de la masa de harina de quinua negra, el aumento de los % de acidez es significativo entre las 24 y 72h (de 0,04 a 0,12), mientras que, en la fermentación inducida de la masa, el aumento significativo se da a partir de las 48 hasta las 96 h (de 0,06 a 0,12). El periodo de aumento de los % de acidez es corto en la fermentación espontánea (24 a 72h), mientras que, en fermentación inducida hay un aumento gradual llegando a un máximo de 0,14 al final de la fermentación.

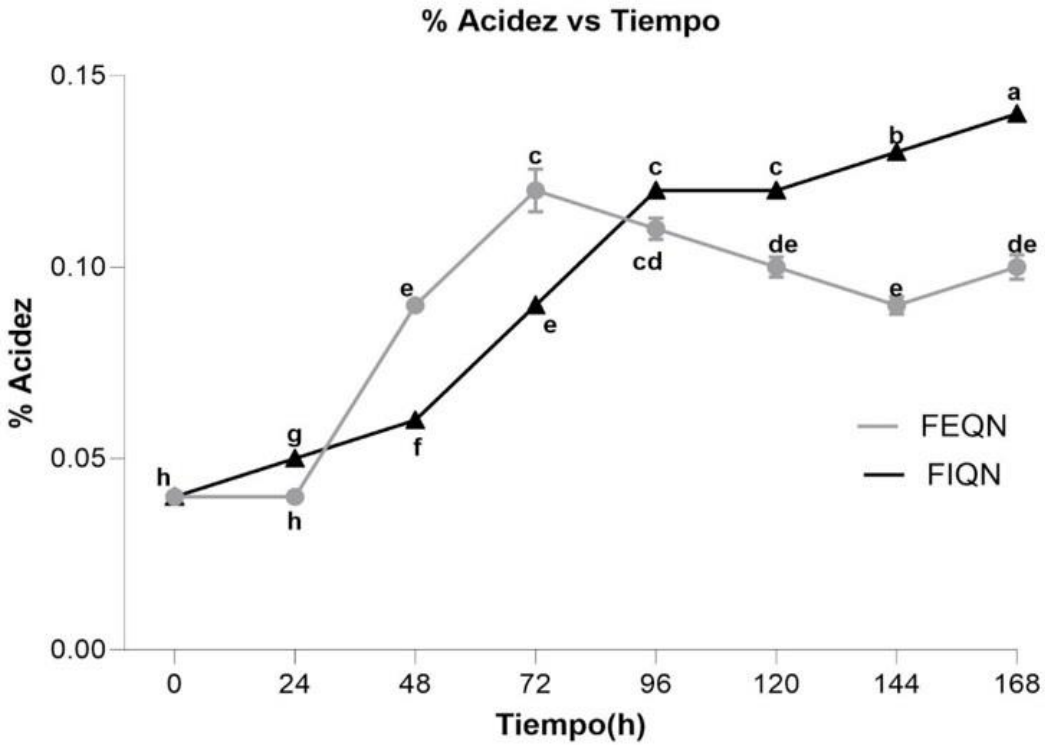


Figura 10. Variación del % de acidez de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua negra (FEQN y FIQN).

La figura 11 muestra que, en la fermentación espontanea de la masa de harina de quinua amarilla, el aumento de los % de acidez es significativo entre las 24 y 72h (de 0,05 a 0,15), mientras que, en la fermentación inducida de la masa, el aumento

significativo se da a partir de las 48 hasta las 96 h (de 0,06 a 0,12). El periodo de aumento de los % de acidez es corto en la fermentación espontánea (24 a 72h), mientras que, en fermentación inducida hay un aumento gradual llegando a un máximo de 0,14 al final de la fermentación.

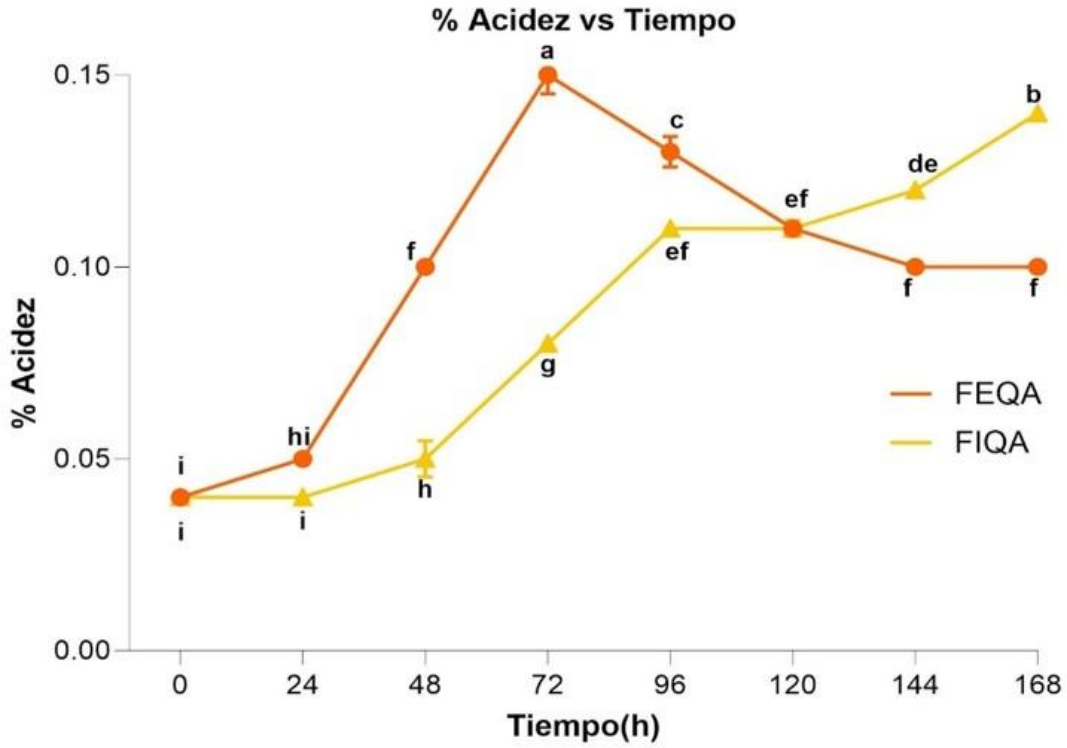


Figura 11. Variación del % de acidez de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua amarilla (FEQA y FIQA).

Los valores de la tabla 11 muestran que, los % de acidez más altos durante la fermentación espontánea de masas de quinua negra y amarilla se obtuvieron a las 72h donde la quinua amarilla obtuvo el valor más alto (0,15) frente a la negra (0,12). En cambio, durante la fermentación inducida, los % de acidez más altos se obtuvieron al final de la fermentación (0,14) sin diferencia estadística entre ambas variedades.

Tabla 11. Variación del % de acidez de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua negra y amarilla (FEQN, FEQA, FIQN y FIQA)

Tiempo (h)	FEQN	FEQA	FIQN	FIQA
0	0,04 ± 0,0015^{k}	0,04±0,0007^{k}	0,04±0,0008^{k}	0,04±0,0012^{k}
24	0,04 ± 0,0014^{k}	0,05±0,0013^{j}	0,05±0,0016^{j}	0,04±0,0013^{k}
48	0,09 ± 0,0004^{g}	0,10±0,0011^{f}	0,06±0,0005^{i}	0,05±0,0047^{ij}
72	0,12 ± 0,0056^{d}	0,15±0,0049^{a}	0,09±0,0005^{g}	0,08±0,0009^{gh}
96	0,11 ± 0,0028^{df}	0,13±0,0040^{c}	0,12±0,0010^{cd}	0,11±0,0019^{de}
120	0,10±0,0026^{fg}	0,11±0,0008^{e}	0,12±0,0005^{d}	0,11±0,0021^{de}
144	0,09±0,0023^{g}	0,10±0,0011^{f}	0,13±0,0014^{c}	0,12±0,0002^{d}
168	0,10±0,0032^{fg}	0,10±0,0008^{f}	0,14±0,0007^{b}	0,14±0,0001^{b}

Los datos mostrados representan el promedio (n=3) ± DS. Las letras diferentes de los superíndices en las columnas y las filas indican diferencias significativas($p<0.05$). FE: fermentación espontánea, FI: fermentación inducida, QN: quinua negra, QA: quinua amarilla

La figura 12 muestra que, en la fermentación espontanea de la masa de harina de quinua negra, la reducción de sólidos solubles es significativo entre las 24 y 72h (de 2,93 a 1,24°Brix), luego se observa leves incrementos y descensos que terminaron con 1,40 °Brix; mientras tanto, en la fermentación inducida hay reducción significativa desde el inicio hasta las 96 h (de 2,90 a 1,20), lo cual se mantiene hasta el final del ensayo. La reducción de sólidos solubles es más lenta en la fermentación espontánea (24h) que la inducida donde hay reducción desde el inicio de fermentación.

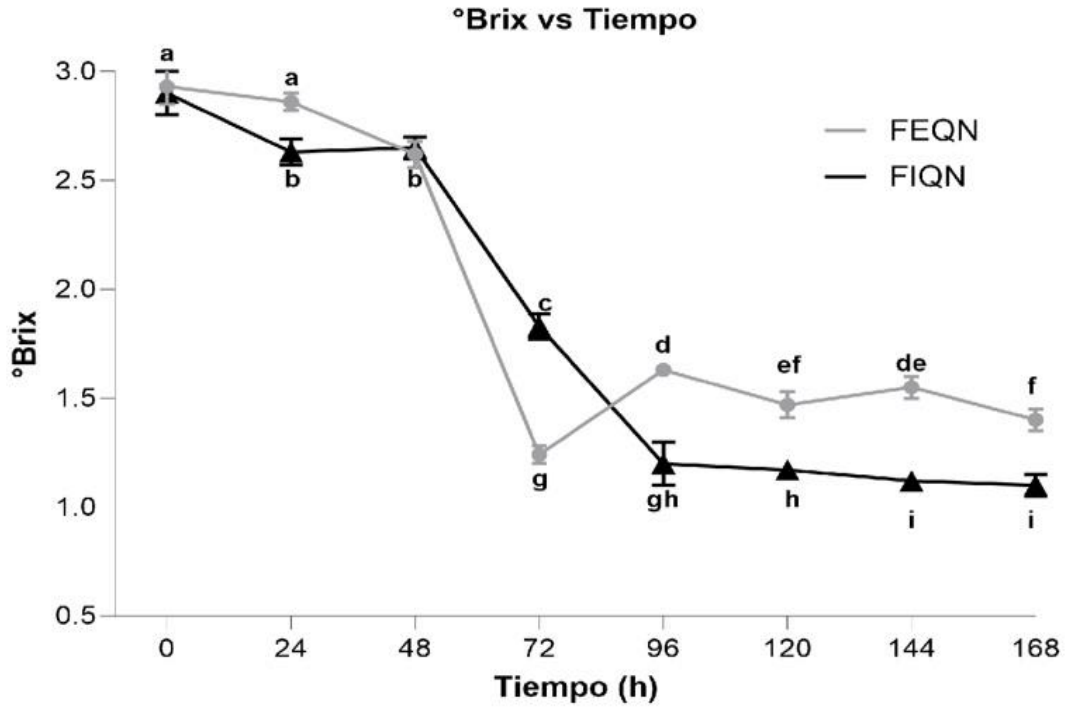


Figura 12. Variación del contenido sólidos solubles de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua negra (FEQN y FIQN).

La figura 13 muestra que, en la fermentación espontanea de la masa de harina de quinua amarilla, la reducción de sólidos solubles es significativo entre las 24 y 72h (de 2,35 a 0,95°Brix), luego se observa incrementos graduales que terminaron con 1,53 °Brix; mientras que, en la fermentación inducida hay reducción significativa desde el inicio hasta las 96 h (de 2,43 a 1,28), lo cual se mantiene sin diferencia significativa hasta el final del ensayo. La reducción de sólidos solubles en la fermentación espontánea empezó a partir de las 24h, mientras que en la inducida hubo reducción desde el inicio.

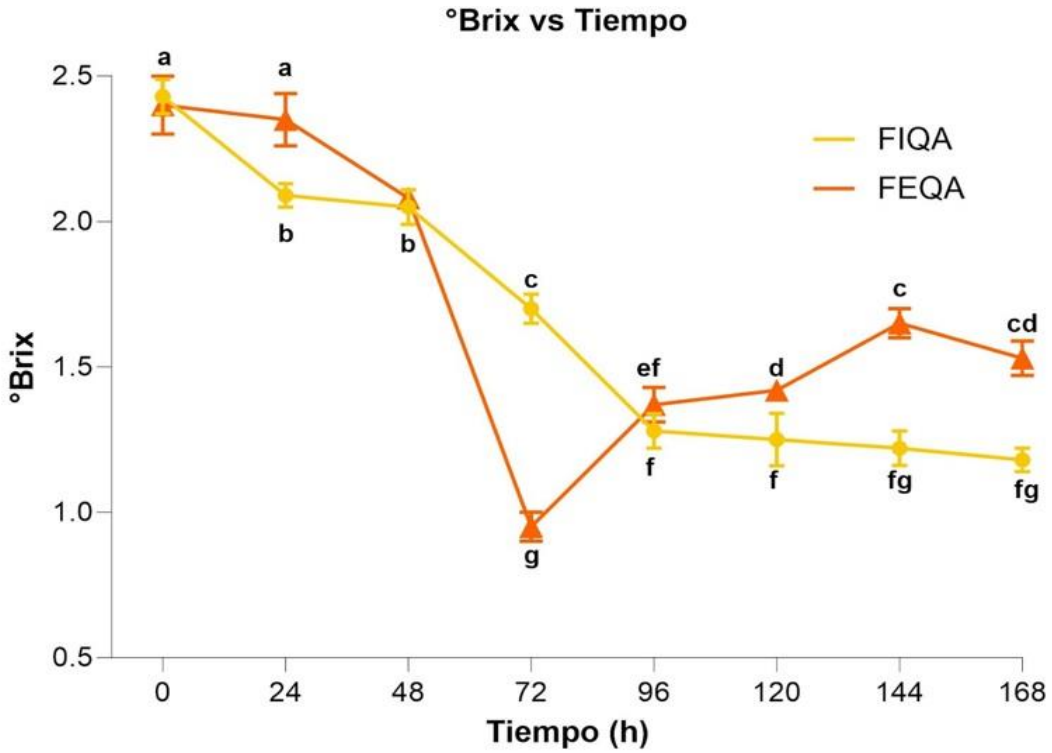


Figura 13. Variación de sólidos solubles de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua amarilla (FEQA y FIQA).

Los valores de la tabla 12 muestran que, durante la fermentación espontánea de masas de quinua negra y amarilla los sólidos solubles son más bajos a las 72h, donde la quinua amarilla obtuvo el valor más bajo (0,95°Brix) frente a la negra (1,24°Brix). En cambio, durante la fermentación inducida, los sólidos solubles son mínimos a las 96h (1,20-1,28 °Brix) sin diferencia significativa entre ambas variedades.

Tabla 12. Variación del contenido sólidos solubles de masas madre durante el tiempo de fermentación espontánea e inducida de quinua negra y amarilla (FEQN, FEQA, FIQN y FIQA).

Tiempo (h)	FEQN	FEQA	FIQN	FIQA
0	2,93 ± 0,08^{a}	2,40± 0,10^{c}	2,90± 0,10^{a}	2,43± 0,06^{c}
24	2,86 ± 0,04^{a}	2,35± 0,09^{c}	2,63± 0,06^{b}	2,09 ± 0,04^{d}
48	2,62±0,06^{b}	2,08± 0,02^{d}	2,65 ± 0,05^{b}	2,05 ± 0,06^{d}
72	1,24 ±0,04^{l}	0,95± 0,05^{m}	1,83 ± 0,06^{e}	1,70 ± 0,05^{f}

96	1,63 ± 0,03^{g}	1,37± 0,06^{kl}	1,20± 0,10^{l}	1,28±0,06^{l}
120	1,47±0,06^{j}	1,42 ± 0,03^{j}	1,17± 0,03^{lm}	1,25± 0,09^{l}
144	1,55 ±0,05^{gh}	1,65 ± 0,05^{g}	1,12± 0,03^{lm}	1,22 ± 0,06^{l}
168	1,40±0,05^{j}	1,53 ± 0,06^{i}	1,10 ± 0,05^{lm}	1,18 ± 0,04^{lm}

Los datos mostrados representan el promedio (n=3) ± DS. Las letras diferentes de los superíndices en las columnas y las filas indican diferencias significativas($p<0.05$). FE: fermentación espontánea, FI: fermentación inducida, QN: quinua negra, QA: quinua amarilla

5.2. Aislamiento, selección e Identificación de levaduras y BAL con actividad fitasa

Las tablas 13 y 14 muestran la agrupación en series de colonias más predominantes de levaduras y BAL con características macroscópicas y microscópicas semejantes aisladas de masas madre, las cuales se complementan con las figuras 14 y 15 en la FEQN y FEQA respectivamente.

La tabla 13 muestran que, las levaduras de la serie 1 destacaron en todos los tiempos de aislamiento (24,72,168h), con colonias medianas y grandes de color crema y de forma celular globosa con gemaciones multipolares (figura 14 serie 1). Asimismo, se destacan las levaduras de la serie 2 que aparecieron a las 72 y 168 h cuyas colonias se diferencian de las anteriores principalmente por el tamaño y color (pequeñas y blancas) con células elipsoidales de gemación unipolar (figura 14 serie 2). También sobresalen las BAL de la serie 5 (aisladas 24,72 y 168 h) con colonias puntiformes de color blanco y células en forma de bacilos cortos (figura 14 serie 5).

Tabla 13. Caracterización macroscópica y microscópica de levaduras y BAL aisladas de masas madre durante la FEQN

N° serie	Código de colonias	Horas de Fermentación	Morfología celular	Morfología de las colonias
1	QNP'24H QN1CG'72H QNC72H QNN"72H QNL72H QNN'72H QN2CG168H	24 72 72 72 72 168	**Forma**: globosa y elipsoidales **Tipo de gemación:** multipolar	**Tamaño:** mediano/grandes **Forma:** circular **Borde**: entero **Color**: crema

	QNA168H	168		
2	QNM'72H QN1CG72H QNB168H	72 72 168	**Forma**: elipsoidal **Tipo de gemación:** unipolar	**Tamaño**: pequeño **Forma**: circular **Borde**: entero **Color**: blanco
5	QNZ24H QNA72H QNI168H	24 72 168	**Forma**: bacilos cortos **Tipo de reproducción:** bipartición	**Tamaño**: puntiforme **Forma**: circular **Borde**: Entero **Color**: Blanco

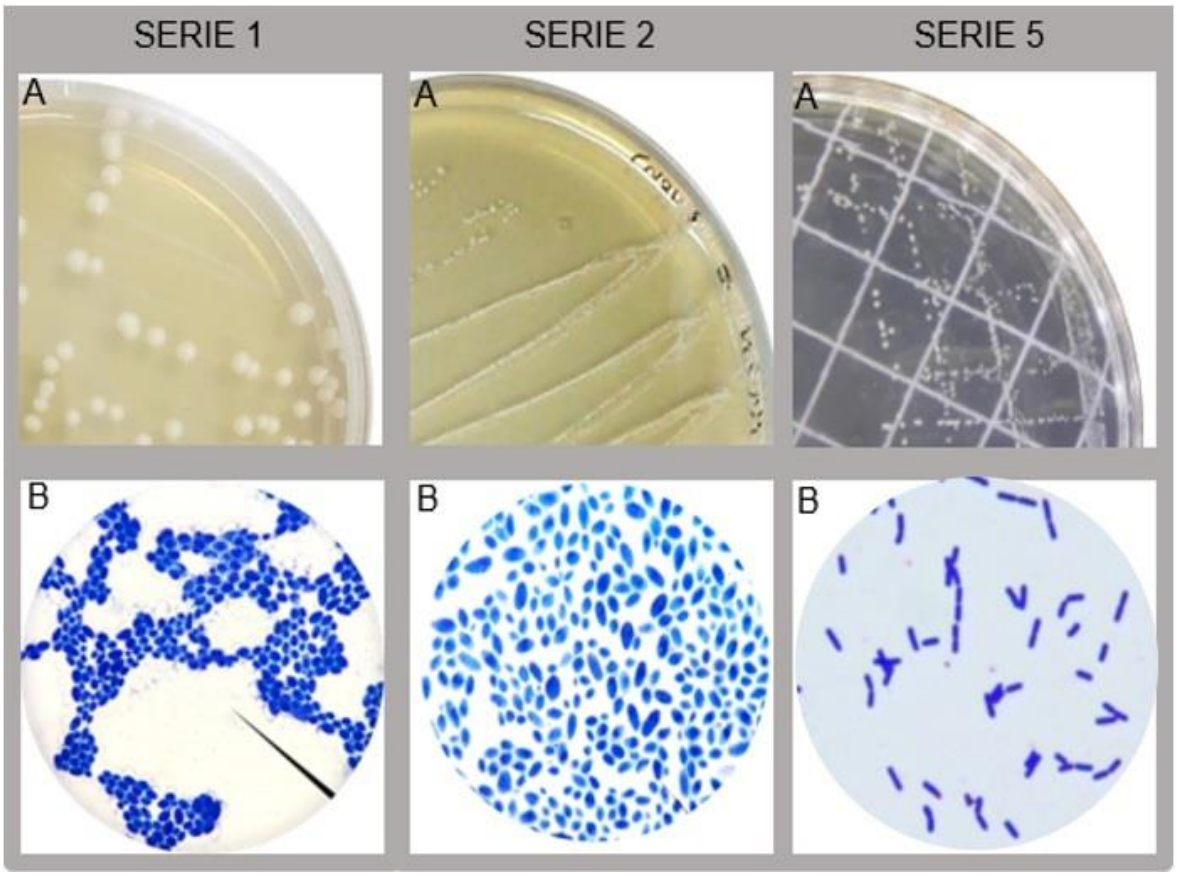


Figura 14. Morfología de colonias **(**A) y células (B) de levaduras (series 1 y 2); y BAL (serie 5) aisladas de masa madre en la FEQN.

La tabla 14 muestra la predominancia de levaduras de la serie 5 (aisladas a 72 y 168 h) con colonias pequeñas de color blanco y células elipsoidales de gemación unipolar (figura 15 serie 5). También se destacan las levaduras de la serie 4 de colonias medianas a grandes colores crema y forma celular globosa con gemaciones multipolares (figura 15 serie 4). Asimismo, las BAL destacables corresponden a la serie 7(aisladas 72 y 168 h) con colonias puntiformes color

blanco y células en forma de bacilos cortos; y la serie 9 con colonias puntiformes color crema y células en forma de cocos (figura 15 serie 9).

Tabla 14. Caracterización macroscópica y microscópica de levaduras y BAL aisladas de masas madre durante la FEQA

N° serie	Código de colonias	Horas de fermentación	Morfología celular	Morfología de las colonias
4	QAA'72H QAE"72H QAC168H	72 72 168	**Forma:** Globosa y elipsoidales **Tipo de gemación**: multipolar	**Tamaño:** mediano/ grande **Forma**: circular **Borde**: entero **Color**: crema
5	QAY"72H QAX72H QAI168H QAA168H QA"C"168H	72 72 168 168 168	**Forma**: Elipsoidal **Tipo de gemación**: unipolar	**Tamaño:** pequeñas **Forma**: circular **Borde**: entero **Color:** blanco
7	QAC24H QAE72H QAG72H QAF168H	72 72 72 168	**Forma**: Bacilos cortos **Tipo de reproducción**: Bipartición	**Tamaño:** pequeños **Forma**: circular **Borde**: entero **Color**: blanco
9	QAJ72H QAD168H	72 168	**Forma**: cocos **Tipo de reproducción**: Bipartición	**Tamaño**: pequeño **Forma:** puntiforme **Borde**: entero **Color**: blanco

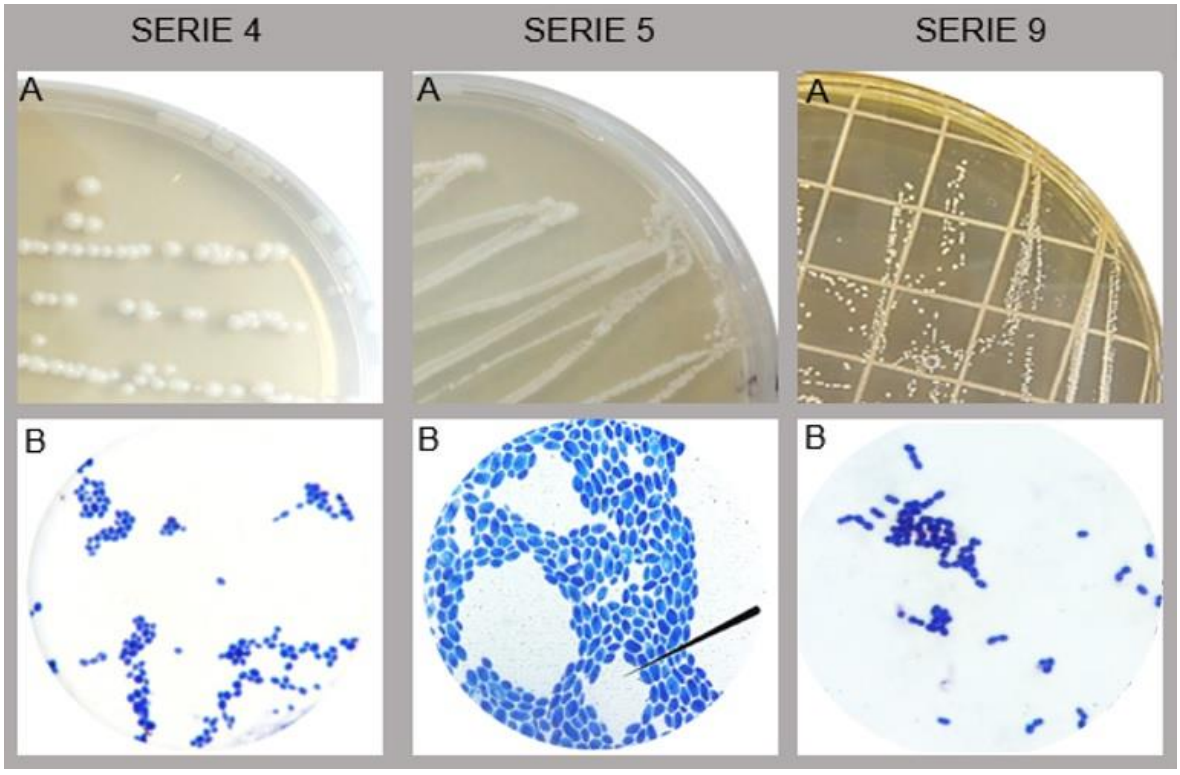


Figura 15. Morfología de colonias **(**A) y células (B) de levaduras (series 4 y 5); y BAL (serie 9) aisladas de masa madre en la FEQA.

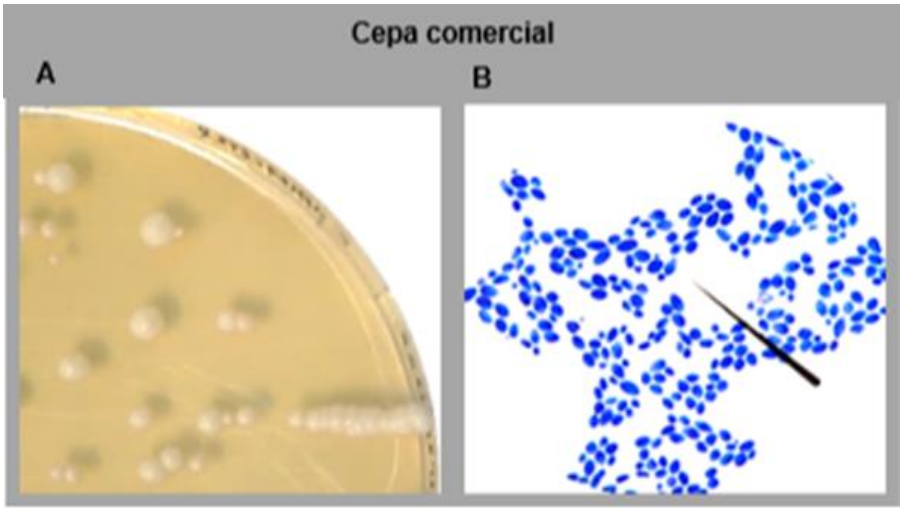


Figura 16. Morfología de las colonias (A) y células (B) de *Saccharomyces cerevisiae* comercial (panadera).

Las colonias de levaduras y BAL aisladas previamente fueron sometidas a la prueba de detección de fitasas y se seleccionaron aquellas que presentaron un diámetro de hidrólisis mayor a 15 mm. Las tablas 15 y 16 muestran los códigos de las colonias seleccionadas, el tiempo en que fueron aisladas, el diámetro formado por la hidrólisis de fitato (mm) y la identificación a través del sistema API: 20C AUX y 32 C para levaduras (*Saccharomyces* y no - *Saccharomyces*) y API 50 CHL para BAL.

La tabla 15 destaca la presencia de *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus plantarum* en los tres tiempos de aislamiento (24, 72 y 168 h) y *Candida pelliculosa* aislada a las 72 y 168 h. Además, *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura con actividad fitasa predominante en esta masa.

Tabla 15. Identificación de levaduras y BAL con actividad fitasa aisladas de masas madre durante la FEQN

Código de los aislados	Horas de fermentación	Hidrólisis de fitato (mm) ± SD	API	Levaduras y BAL
QNP'24H	24	15,65 ± 0,21	32C	*Saccharomyces cerevisiae*
QNP''24H		15,3 ± 0,14		*Candida colliculosa*
QNF24H		15,45 ± 0,07		*Candida colliculosa*
QNM''24H		16,75 ± 0,07		*Candida krusei*
QNZ24H		15,25 ± 0,14		*Lactobacillus plantarum*
QN1CG'72H	72	19,40 ± 0,14	32C 50CH L	*Saccharomyces cerevisiae*
QNC72H		20.60 ± 0,14		*Candida pelliculosa*
QNM'72H		19,10 ± 0,14		*Candida pelliculosa*
QN1CG72H		18,10 ± 0,14		*Saccharomyces cerevisiae*
QNN''72H		20,15 ± 0,21		*Saccharomyces cerevisiae*
QNL72H		20.65 ± 0,21		No identificado
QNN'72H		16,90 ± 0,14		No identificado
QNA72H		16,25 ± 0,07		*Lactobacillus plantarum*
QN2CG168H	168	17,25 ± 0,07	20C AUX	*Saccharomyces cerevisiae*
QNB168H		15,9 ± 0,14		*Candida pelliculosa*
QNA168H		17,65 ± 0,21		*Saccharomyces cerevisiae*
QNI168H		15,05 ± 0,07		*Lactobacillus plantarum*

En la tabla 16 destaca la presencia de *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus plantarum* en los tres tiempos de aislamiento (24, 72 y 168 h) y *Candida pelliculosa* aislada a las 72 y 168 h. Además, *Candida pelliculosa* es la levadura con actividad fitasa predominante en esta masa.

Tabla 16. Identificación de levaduras y BAL con actividad fitasa aisladas de masas madre durante la FEQA.

Código de colonias	Horas de fermentación	Hidrólisis de fitato (mm) ± SD	API	Levaduras y BAL

QAA'24H	24	16,15 ± 0,21	32C	*Saccharomyces cerevisiae*
QAY'24H		16,4± 0,14		*Candida holmii*
QAθ24H		17,1± 0,14		*Candida kefyr*
QAE'24H		17,15± 0,21		*Candida kefyr*
QAB24H		15,3 ± 0,14		*Candida krusei*
QAA"24H		15,15 ± 0,21		No identificado
QAG24H		16, 25 ± 0,25		*Lactobacillus plantarum*
QAE"72H	72	19,75± 0,35	32C 50CHL	*Saccharomyces cerevisiae*
QAY"72H		19,6 ± 0,14		*Candida pelliculosa*
QAX72H		18,35 ± 0,07		*Candida pelliculosa*
QAI72H		19,35 ± 0,07		*Candida pelliculosa*
QAR72H		18,65± 0,21		No identificado
QAC72H		15,10 ± 0,14		*Lactobacillus plantarum*
QAE72H		16, 50 ± 0,14		*Lactobacillus plantarum*
QAC168H	168	15,65 ± 0,21	20C AUX	*Saccharomyces cerevisiae*
QAA168H		15,2 ± 0,07		*Candida pelliculosa*
QA"D"168H		15,3± 0,14		*Candida pelliculosa*
QA"C"168H		15,9 ± 0,14		*Candida pelliculosa*
QA"B"168H		16,75 ± 0,07		*Candida guilliermondii*
QAF168H		15,5 ± 0,07		*Lactobacillus plantarum*
QAB168H		16,15± 0,07		No identificado
QA"A"168H		15,7± 0,14		No identificado

La figura 17 muestra los halos formados por la hidrólisis del fitato a causa de las fitasas de levaduras y BAL. En las masas madre de la FEQN, *Saccharomyces cerevisiae* alcanzó un máximo de 20,65 mm, seguido de *Candida pelliculosa* con 19,1 mm y *Lactobacillus plantarum* con 15,25 mm; mientras que, en las masas madre de la FEQA la zona de hidrólisis *Saccharomyces cerevisiae* (19,75 mm) es comparable a *Candida pelliculosa* (19,6 mm) y *Lactobacillus plantarum* tiene el menor tamaño (16, 50 mm). Por otro lado, la figura 18 muestra el halo formado por las fitasas de *Saccharomyces cerevisiae* cepa comercial con 19,5 mm.

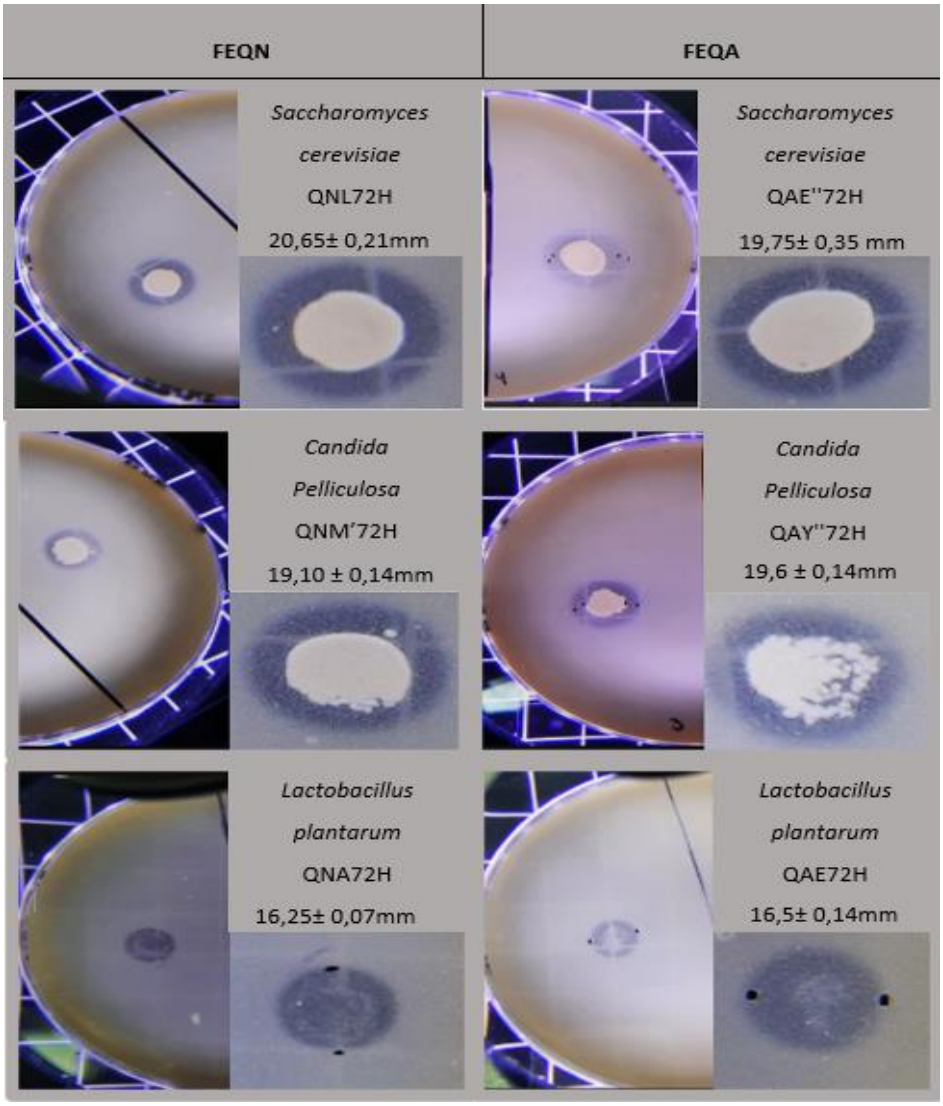


Figura 17. Diámetros de halos formados en la hidrólisis del fitato por las fitasas de levaduras y BAL en agar MDF aisladas de masas madre en la FEQN y FEQA.

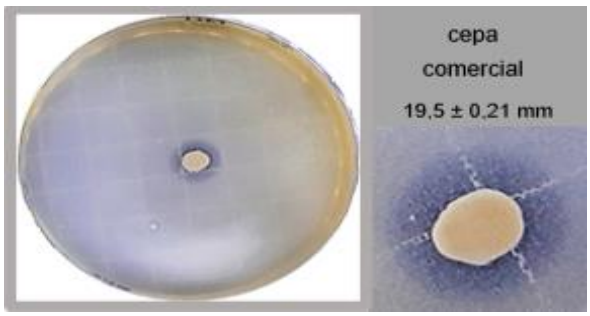


Figura 18. Diámetros del halo formado en la hidrólisis del fitato por fitasas de *Saccharomyces cerevisiae* cepa comercial (panadera) en agar MDF.

5.3. Cuantificación de fitatos durante proceso de fermentación espontánea e inducida

La figura 19 muestra que, en la FEQN el % de reducción aumenta gradualmente hasta un máximo de 65,76 % a las 72 h, decae moderadamente (50,71%) a las 96 h y finaliza con 47,76%; en tanto que, en la FIQN el % de reducción aumenta hasta 75,42% a las 96 h y se mantiene con pequeñas diferencias significativas hacia el final de la fermentación, terminando con un máximo de 81,54%.

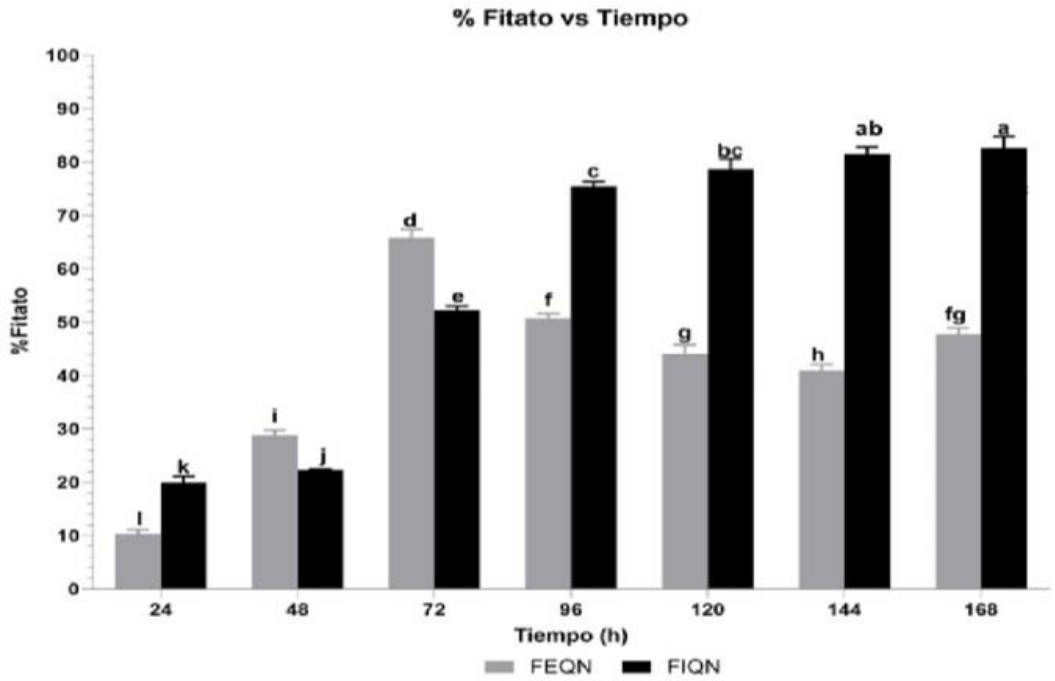


Figura 19. Variación de la reducción porcentual de fitatos de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua negra (FEQN y FIQN).

La Figura 20 se observa que, en la FEQA hay incremento del % de reducción (69,46%) hasta las 72h, se mantiene constante a las 96 h, decae ligeramente (49,74%) a las 120h y termina con 40,97%. Mientras que, en la FIQA hay incremento significativo del % de reducción (73,49 %) hasta las 96 h y se mantiene con mínimas diferencias significativas hasta el final de la fermentación.

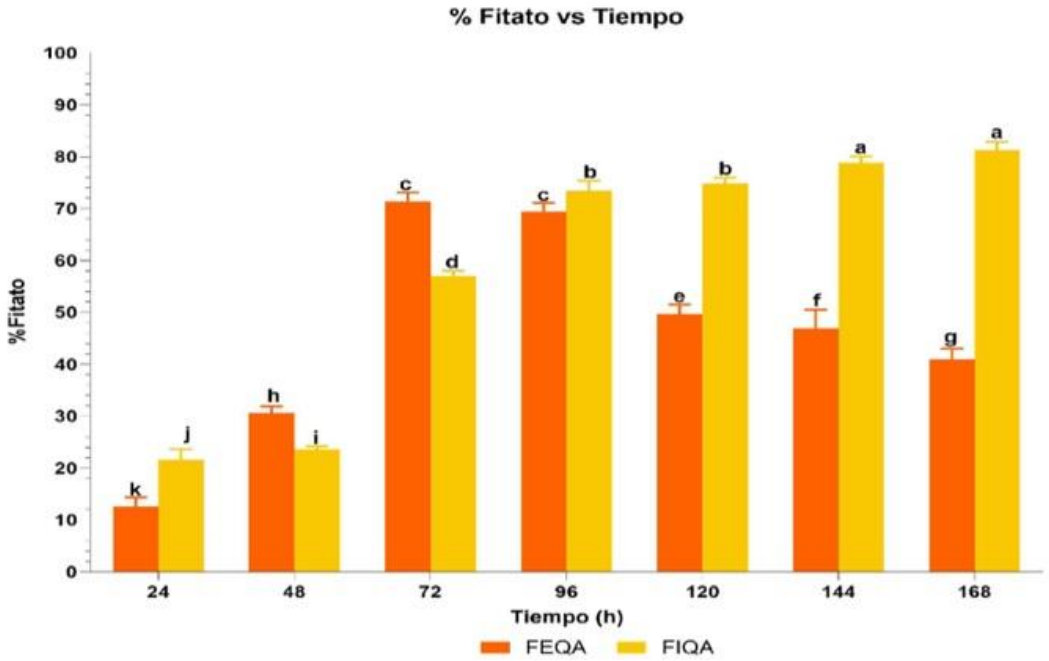


Figura 20. Variación de la reducción porcentual de fitatos de masas madre durante el tiempo de fermentación espontanea e inducida de quinua negra (FEQA y FIQA).

Los valores de la tabla 17 muestran que, durante la fermentación espontánea de masas de quinua negra y amarilla los % de reducción son máximos a las 72h, donde la quinua amarilla tuvo el valor más alto (71,45%) frente a la negra (65,76%). En cambio, durante la fermentación inducida, los % de reducción son mayores (75,42-73,49) a partir de las 96h, sin diferencia significativa entre ambas variedades.

Tabla 17. Variación de la reducción porcentual de fitatos de masas madre durante el tiempo de fermentación espontánea e inducida de quinua negra y amarilla (FEQN, FEQA, FIQN y FIQA)

Tiempo (h)	FEQN	FEQA	FIQN	FIQA
24	10,31 ± 0,81^{o}	12,63±1,74^{o}	19,92±1,16^{n}	21,55±2,08^{n}
48	28,84±0,95^{l}	30,66±1,23^{l}	22,32±0,19^{m}	23,63±0,55^{m}
72	65,76±1,61^{e}	71,45±1,67^{d}	52,27±0,75^{g}	57,00±0,98^{f}
96	50,71±0,94^{h}	69,46±1,61^{d}	75,42±0,92^{c}	73,49±1,88^{cd}
120	43,99±1,77^{k}	49,74±1,79^{i}	78,64±2,01^{bc}	74,81±1,17^{cd}

144	40,98±1,11^{kl}	46,94±3,59^{j}	81,54±1,26^{ab}	78,82±1,21^{b}
168	47,76±1,21b^{ij}	40,97±2,01^{kl}	82,65±2,12^{a}	81,33±1,55^{ab}

Los datos mostrados representan el promedio (n=3) ± DS. Las letras diferentes de los superíndices en las columnas y las filas indican diferencias significativas($p<0.05$). FE: fermentación espontánea, FI: fermentación inducida, QN: quinua negra, QA: quinua amarilla

VI. DISCUSIÓN

La fermentación es una técnica eficaz en la reducción de fitatos, especialmente la fermentación tipo masa madre donde se desarrolla principalmente la fermentación láctica por BAL, donde se generan condiciones de pH óptimos para la activación de fitasas endógenas (propias de la harina) y exógenas de BAL y levaduras generadas durante la en la fermentación espontánea o añadidas en la fermentación inducida (*Saccharomyces cerevisiae* cepa panadera)[9].

En la primera etapa del estudio se caracterizaron primero las harinas, y dentro de los resultados de características fisicoquímicas (tabla 8), el pH de las harinas de quinua negra (6, 43 ± 0,03) y amarilla fue (6,53 ± 0,02), asimismo, los % de acidez (0,19 ± 0,0054% y 0,14 ± 0,0029 % respectivamente) valores que fueron similares a pH (6,5) y acidez (0,175) reportados por Franco et al.[13] De otro lado, los valores de humedad de la harina de quinua negra (11,44 ± 0,77%) y amarilla (12,04 ± 0,67) se encuentran por debajo de 13,5 %, límite establecido por la Norma Técnica Peruana 011.451:2013[82] para evitar el crecimiento de microorganismos patógenos y permitir una buena conservación de la harina. El contenido de fitatos en las harinas de quinua negra (1,86 ± 0,08%) y amarilla (1,51±0,04%) se encuentran dentro de los valores previamente reportados (0,752% - 2,47% p/p ms[5]. La diferencia en el contenido de fitatos podría estar relacionado con factores geográficos ya que la investigación de Rosero et al.[16] hallaron mayor contenido de fitatos en una variedad de quinua peruana (1,941%) que en bolivianas (1,859% y 1,433%) o colombiana (0,979%).

En la segunda etapa, se realizó la fermentación espontánea e inducida y se registró la variación de las características organolépticas y fisicoquímicas de las masas para evaluar la influencia en la reducción de fitatos durante el proceso de maduración de la masa madre.

Los resultados de las características organolépticas se presentan en la tabla 9 y muestran que las masas en la FIQN y FIQA tuvieron una fermentación perceptible desde el inicio (olor predominante alcohólico, sabor neutro a ligeramente ácido y un aumento de volumen visible), sin embargo, las características organolépticas propias de una masa madre[63] (olor predominantemente láctico +++, sabor ácido +++ y volúmenes mayores entre 750-850mL) se percibieron a partir de las 72h y se

mantuvieron sin variaciones drásticas hasta el final de la fermentación. Los cambios de una característica a otra podrían indicar que la predominancia de levaduras comerciales al inicio pudo ser desplazada por BAL con el tiempo, ya que estas son microorganismos estrictamente fermentativos que se adaptan mejor a una masa madre[32], la alta producción de ácido láctico pudo haber desplazado el olor alcohólico y acidificar más la masa. Por el contrario, la fermentación en las masas de la FEQN y FEQA se percibieron recién a partir de las 24h, retraso que podría deberse a procesos de adaptación lenta de la microbiota presente[15] o al contenido importante de saponinas que impide su rápido desarrollo e incluso las inhibe[7]. Sin embargo, las características organolépticas propias de masa madre se adquirieron antes que la fermentación inducida (48h) y se mantuvieron estables hasta las 96 horas, luego decayeron ligeramente a partir de 120h, sobre todo en las masas de quinua amarilla, posiblemente por crecimiento de bacterias indeseables que pudieron ser añadidas durante los refrescos de masa y alteraron ligeramente las características organolépticas de la masa, esto favorecido también por la alta actividad de agua (0,98) siendo una de las desventajas de realizar masas madre líquidas (DY>200)[12,83,84].

Simultáneamente se registraron las características fisicoquímicas de las masas durante la fermentación donde los valores de pH y % de acidez se correlacionaron de manera inversa. En las figuras 8 y 9 se observan tres etapas en la variación del pH en la fermentación espontánea e inducida de ambas variedades: una ligera caída, FE(0-24h) y FI (0-48h); descenso notable, FE (24-72h) y FI (48-96 h), ligeras variaciones en la FE (72-168 h) y valores estables en la FI (96-168 h).

Los resultados de la variación de los pH de las masas (tabla 10) indican una caída notable del pH hasta 4,96 (FEQN) y 4,48 (FEQA) a las 72 h y la variación de los % de acidez (tabla 11) muestran aumento significativo hasta 0,12 (FEQN) y 0,15 (FEQA) en el mismo tiempo. Los valores hallados fueron similares a los reportados por Franco et al.[13], pH (4,5) y % de acidez (0,15) a 72 h, quienes realizaron la FE de masas de quinua por 8 días a 30°C. Asimismo, Canaviri et al.[11] encontraron una caída significativa hasta 4,17 – 4,06 desde un pH inicial 6,20 y registraron un valor mínimo de 3,91 al final de la fermentación (192h). Es necesario mencionar que las masas madre maduras se caracterizan por tener pH ácidos, alrededor de 4 (de

acuerdo a estudios realizados en masas madre de trigo) que debería mantenerse constante o con ligera tendencia a la baja tras la caída de pH[63], sin embargo, se presentaron ligeros aumentos después de las 72 h obteniendo un pH final alrededor de 5, que podría estar relacionado con los mecanismos de adaptación al medio ácido de ciertas BAL que producen NH_3 y aumentan el pH dentro y fuera de las células[83]. En cambio, en la fermentación inducida (FI), los pH y % de acidez tuvieron un comportamiento más uniforme y los pH muestran caída significativa de 48 a 96 h(tabla 10) llegando a valores de 4,77 (FIQN) y 4,85 (FIQA) y aumentos en los % de acidez (tabla 11) hasta 0,12 (FIQN) y 0,11 (FIQA), posterior a ello las variaciones fueron mínimas con pH finales entre 4,6-4,8 y % de acidez de 0,13-0,14, suceso que indicaría que la adición de levaduras de panadería contribuye con la estabilidad de la masa.

En cuanto al contenido de sólidos solubles fue variable en los tiempos de fermentación como se observa en las figuras 12 y 13. Los resultados de la variación de sólidos solubles (tabla 12) muestran reducción mínima a las 24h, moderada a 48h y significativa a las 72 h en la FEQN (1,24 ±0,04) y FEQA (0,95± 0,05) con ligeros aumentos y reducciones de 96-168h. En comparación con la fermentación inducida que mostró reducción moderada en las primeras 24 h y significativa de 48 a 96 h en la FIQN (1,20± 0,10) y FIQA (1,28±0,06) con poca variación a partir de las 120 hasta el final. El comportamiento variable en ambos tipos de fermentación se asemeja a lo encontrado por Falciano et al.[34] quienes observaron un aumento gradual de azúcares fermentables hasta 96 h, reducción significativa hacia las 120 h y un leve aumento al final de la fermentación de masas madre de harina de trigo. Cabe indicar que las diferencias en los tiempos pueden ser debido a que se trata de otro alimento con diferente composición nutricional y carga microbiana, por lo que se puede entender que el contenido de sólidos solubles en las masas fermentadas puede variar de acuerdo a la abundancia y requerimientos nutricionales de la microbiota presente (BAL y Levaduras). Asimismo, donde hay aumento de sólidos solubles se justifica porque provienen de hidrólisis de almidones a azúcares fermentables (maltosa, glucosa, fructosa) por parte de las amilasas propias de la harina de quinua principalmente y de BAL, y se pude llegar

a un punto donde la producción y consumo adquieren cierto equilibrio en masas madre estables[85].

Complementariamente se realizó el aislamiento de levaduras y BAL con actividad fitasa para identificar aquellas que podrían contribuir con la reducción de fitatos en la fermentación espontánea. Las tablas 13 y 14 muestran la agrupación en series de colonias con iguales características macroscópicas y microscópicas, aisladas en diferentes tiempos (24, 72 y 168 h) de las masas de la FEQN y FEQA; mientras que las tablas 15 y 16 muestra cuáles de estas colonias pasaron la prueba de detección de fitasas y su respectiva identificación por el sistema API. De acuerdo con ello, las especies que aparecieron con mayor frecuencia fueron *Saccharomyces cerevisiae* y predominaron en las masas de la FEQN (figura 14, serie1), asimismo, se observó que las características macroscópicas y microscópicas fueron similares a la cepa comercial o panadera (figura 16). Otra especie común fue *Candida pelliculosa* (anamorfo de *Wikerhamomyces anomalus*) y predominaron en las masas de la FEQA (figura 15 serie 5). Entre las BAL, *Latobacillus plantarum* fue la única con actividad fitasa (figura 14 serie 5) y fue predominante en la masa de la FEQN, mientras que, en la FEQA, además de *Latobacillus plantarum* predominaron las BAL en forma de cocos (figura 15 serie 9). Estos microorganismos también fueron reportados por Franco et al.[13] quienes identificaron *Candida pelliculosa*, *Pichia kudriavzevii* y *Sacharomyces cerevisiae* en masas madre de quinuas comerciales al final de una fermentación de 8 días, e indicaron que *Lactobacillus plantarum* fue común en la mayoría de las variedades de quinua, tal como se reportó en este estudio (tablas 15 y 16). Por su parte, Rizzello et al.[15] identificaron *Lactobacillus plantarum* tanto en la harina como en masas de quinua fermentadas espontáneamente donde fueron dominantes indicando que esto se debe particularmente a su metabolismo versátil (heterofermentativo facultativo).

En cuanto a la actividad fitasa la figura 17 muestra un mayor tamaño de hidrólisis en las levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* (20-21 mm) y *Candida pelliculosa* (19-20 mm) en comparación con *Lactobacillus plantarum* (16-17mm). Además, en la figura 18 se observa que, el tamaño de hidrólisis de *Saccharomyces cerevisiae* cepa comercial o panadera (19,5 mm) fue similar a las cepas nativas. Estos resultados se aproximan a lo reportado por Menezes et al.[44] quienes encontraron

halos de hidrólisis entre 19-26 mm en diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de alimentos fermentados espontáneamente. Asimismo, Li et al.[86] detectaron que *Candida pelliculosa* cepa P4 tiene actividad fitasa en medio sólido (agar MDF) y reportó una buena actividad fitasa extracelular de esta especie. Por su parte, en el estudio de Anastasio et al.[87] realizaron la detección de actividad fitasa en medio sólido (agar MDF) de varias cepas de BAL y encontraron halos más grandes en las cepas aisladas de cereales siendo la más representativa *Lactobacillus plantarum* que alcanzó un tamaño de hidrólisis de 13 mm, un tamaño ligeramente menor al obtenido en este estudio (alrededor de 16 mm, figura 17). Cabe indicar que las actividades fitasa dependen de la cepa más que la especie[88] y que los tamaños de halos formados por la hidrólisis del fitato pueden estar relacionados con la concentración de enzimas, por lo que halos más grandes significarían mayor producción de enzimas extracelulares[49].

La mayoría de fitasas degradadoras de fitatos son ácidas y sus pH óptimos van desde 4,5 a 6,0 motivo por el cual se indica que la degradación de fitatos depende de la caída del pH hasta condiciones óptimas en donde se activen la fitasa endógena y microbiana[7,51,88].

En la tercera etapa se cuantificaron los contenidos de fitato. Las figuras 19 y 20 muestran diferencias significativas en la reducción de fitatos entre la fermentación espontánea e inducida a través del tiempo, con mínimas diferencias significativas entre variedades quinua negra y amarilla. Dentro de los resultados de los porcentajes de reducción de fitatos (tabla 17) en la FEQN y FEQA se observan incrementos ligeros (24h: 10-12%), moderados (48 h: 28-30%) y mayores % de reducción a las 72 h con valores máximos de 65,76 % y 71,45% en la FEQN y FEQA respectivamente, que coinciden con los pH más bajos (FEQN: 4,96 ± 0,02 y FEQA: 4,48 ± 0,03) (tabla 10), asimismo, se hallaron más colonias de levaduras y BAL con actividad fitasa, siendo las más representativas: *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida pelliculosa* y *Lactobacillus plantarum* en ese tiempo (tablas 15 y 16). Los resultados encontrados podrían ser comparables a lo reportado por Carrizo[48], quien encontró una reducción poco significativa en masas de quinua fermentadas espontáneamente a las 24 h, pero sí halló una reducción del 50% cuando las masas se iniciaron con *Lactobacillus plantarum* y el pH se redujo 4,1.

Asimismo, Castro et al.[7] reportaron reducción significativa de fitatos de 82-85 % en masas de quinua inducidas con *Lactobacillus plantarum* cuando el pH se redujo a 3,98. Con relación a ello la investigación indica que el aporte principal de las BAL en la hidrólisis del fitato es en la reducción de pH y cuando son aplicados como iniciadores proporcionan pH óptimos para la degradación de fitatos en menor tiempo[7,51], motivo por el cual en esta investigación se tardó más tiempo en encontrar el pH óptimo en la fermentación espontánea ya que el escaso inóculo de BAL presentes al inicio tuvieron que pasar por un proceso de adaptación y proliferación en la masa para generar dichas condiciones de pH[12].

Los resultados de los porcentajes de reducción de fitatos en las masas de la FIQN y FIQA (tabla 17) muestran un incremento ligero (24 h y 48 h: 20-24%), moderado (72 h: 50-57%) y porcentajes de reducción máximos a partir de las 96 h hasta el final de la fermentación con valores de entre el 70 y 80% cuando los pH se establecían entre 4,66 - 4,85 (tabla 10). Los porcentajes de reducción de fitatos reportados a las 24 h (tabla 17), alrededor del 20%, difieren de lo encontrado por Arjmand et al.[10] quienes realizaron la fermentación de masas de quinua a 37°C iniciados con *Saccharomyces cerevisiae* y encontraron una reducción de 47.58 % en menos de 24h e indicaron que podría deberse a la velocidad de generar condiciones para la degradación del fitato. No obstante, es preciso indicar que la cantidad de inóculo (2,2%p/p) empleada y la temperatura (37°C) fueron mayores a los empleados en el presente estudio (0,5 %p/p de inóculo y temperatura ambiente), factores que pudieron influenciar en la velocidad de degradación, sin embargo, se encontró porcentajes de reducción semejantes y mayores a partir de las 72 h (52 - 57%) y de 96-168 h (73 - 81%). Al respecto, Reale et al.[51] demostraron que la tasa de degradación de fitatos de *Saccharomyces cerevisiae* es más lenta que las BAL cuando se usan como iniciadores de masas madre de harina de trigo, ya que la caída pH hasta el óptimo tuvo lugar en más tiempo, por lo que obtuvieron una reducción total de fitatos a 36 h de fermentación cuando el pH se redujo alrededor de 5, además indicaron que los pH adecuados para la degradación de fitatos están alrededor entre 4,5 a 5,5.

Finalmente, se encontró que lo común entre la fermentación espontánea e inducida son los incrementos progresivos en los porcentajes de reducción de fitatos acorde

con la caída de pH hasta cierto tiempo (FE: 72 h y FI: 96 h), posterior a ello se observó una cierta estabilidad en la FI, mientras que en la FE los porcentajes de reducción disminuyeron a valores cercanos al 40% (tabla 17) que coincidieron con una ligera inestabilidad del pH (ligeros aumentos) (tabla 10), esto podría sugerir que la adición de levaduras de panadería como iniciadores (0,5 % p/p) contribuyen en la estabilidad de las masas madre por más tiempo (96-168h), manteniendo las características organolépticas propias de la masa madre (aroma láctico, sabor ácido y mayores volúmenes) y pH adecuados para la hidrólisis del fitato donde haya aporte tanto de fitasas endógenas como microbianas (pH > 4,5 <5,5) a partir de las 96h.

VII. CONCLUSIONES

- Las características organolépticas típicas de masa madre (olor láctico y sabor ácido: +++ y mayores volúmenes) se percibieron de 48 a 96 h en las masas madre de la FEQN y FEQA y de 72 a 168 h en la FIQN y FIQA los cuales coincidieron con pH bajos entre 4,5 - 5,5, mayores % de acidez y menor contenido de sólidos solubles.

- Se identificaron levaduras y BAL con actividad fitasa durante la fermentación espontánea de las masas madre de harinas de quinua amarilla y negra siendo las más frecuentes *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pelliculosa* y *Lactobacillus plantarum*. Asimismo, se comprobó que *Saccharomyces cerevisiae* cepa comercial usada como cultivo iniciador en la fermentación inducida presentó actividad fitasa.

- Durante la fermentación espontánea e inducida de masas madre de harinas de quinua negra Collana y amarilla Kancolla se evidenció que la degradación de fitatos fue paulatina. En ambos tipos de fermentación hubo una reducción significativa de fitatos, resultando la mayor reducción de fitatos en las masas madre con fermentación inducida de quinua negra Collana (75-83 %) y amarilla Kancolla (73-81%)) entre los 96-168 h de fermentación; en las masas madre con fermentación espontánea, la mayor reducción fue entre los 72 y 96 h de fermentación, de 51-65% para la masa madre de quinua negra Collana y 69-71% en la amarilla Kancolla.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar recuentos microbianos en cada tiempo de fermentación espontánea e inducida con *Saccharomyces cerevisiae* cepa comercial para evaluar la evolución de la microbiota de masas madre.
- Evaluar la actividad fitasa cuantitativa de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pelliculosa*, *Lactobacillus plantarum* aisladas de masas madre de harina de quinua y *S. cerevisiae* cepa comercial.
- Cuantificar la actividad fitasa endógena de la quinua negra Collana y amarilla Kancolla.
- Realizar estudios de obtención masa madre de harina de quinua negra y amarilla con temperatura controlada y evaluar la reducción de fitatos.
- Realizar investigaciones sobre reducción de fitatos en otros cereales andinos mediante la masa madre.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Flores E, Rodriguez R, Arce N, y García G. Cultura y comportamiento del consumidor de quinua como producto orgánico. Idesia (Arica). [Internet]. 2022 [Citado el 12 de febrero de 2024]; 40(2), 133-142. Disponible en: https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292022000200133
2. Ames BN. La ingesta baja de micronutrientes puede acelerar las enfermedades degenerativas del envejecimiento mediante la asignación de micronutrientes escasos mediante clasificación. Proc Natl Acad Sci EE.UU. [Internet]. 2006 [citado el 12 de febrero de 2024];103(47):17589–94. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0608757103
3. Vega-Gálvez A, Miranda M, Vergara J, Uribe E, Puente L, Martínez EA. Datos nutricionales y potencial funcional de la quinua (*Chenopodium quinoa* willd.), un antiguo grano andino: una revisión. J Sci Food Agric [Internet]. 2010 [citado el 12 de febrero de 2024];90(15):2541–7. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20814881/
4. Filho AMM, Pirozi MR, Borges JTDS, Pinheiro Sant'Ana HM, Chaves JBP, Coimbra JSDR. Quinoa: Nutritional, functional, and antinutritional aspects. Crit Rev Food Sci Nutr [Internet]. 2017 [citado el 12 de febrero de 2024];57(8):1618–30. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26114306/
5. Castro-Alba V, Lazarte CE, Bergenståhl B, Granfeldt Y. Phytate, iron, zinc, and calcium content of common Bolivian foods and their estimated mineral bioavailability. Food Sci Nutr [Internet]. 2019 [citado el 12 de febrero de 2024];7(9):2854–65. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31572579/
6. Schlemmer U, Frølich W, Prieto RM, Grases F. Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. Mol Nutr Food Res [Internet]. 2009 [citado el 12 de febrero de 2024];53(S2). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19774556/
7. Castro-Alba V, Lazarte CE, Perez-Rea D, Carlsson N-G, Almgren A, Bergenståhl B, et al. Fermentation of pseudocereals quinoa, canihua, and amaranth to improve mineral accessibility through degradation of phytate. J Sci Food Agric [Internet]. 2019 2009 [citado el 12 de febrero de 2024];99(11):5239–48. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.9793
8. Dailin DJ, Hanapi SZ, Elsayed EA, Sukmawati D, Azelee NIW, Eyahmalay J, et al. Fungal Phytases: Biotechnological Applications in Food and Feed Industries. En: Yadav, A., Singh, S., Mishra, S., Gupta, A. (eds). Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi. Malasia: Springer, Cham International Publishing; 2019 [citado el 18 de febrero 2024]. p. 65-99.

Chapter 2. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-030-14846-1_2.

9. Fekri A, Torbati M, Yari Khosrowshahi A, Bagherpour ShamLoo H, Azadmard-Damirchi S. Functional effects of phytate-degrading, probiotic lactic acid bacteria and yeast strains isolated from Iranian traditional sourdough on the technological and nutritional properties of whole wheat bread. Food Chem [Internet]. 2020 [citado el 12 de febrero de 2024];306(125620):125620. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125620
10. Arjmand S, Mollakhalili-Meybodi N, Akrami Mohajeri F, Madadizadeh F, Khalili Sadrabad E. Quinoa dough fermentation by Saccharomyces cerevisiae and lactic acid bacteria: Changes in saponin, phytic acid content, and antioxidant capacity. Food Sci Nutr [Internet]. 2023 [citado el 12 de febrero de 2024];11(12):7594–604. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.3679
11. Canaviri-Paz P, Oscarsson E, Håkansson Å. Autochthonous microorganisms of white quinoa grains with special attention to novel functional properties of lactobacilli strains. J Funct Foods [Internet]. 2021 [citado el 14 de febrero de 2024];84(104586):104586. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2021.104586
12. García-Béjar B, Fernández-Pacheco P, Carreño-Domínguez J, Briones A, Arévalo-Villena M. Identification and biotechnological characterisation of yeast microbiota involved in spontaneous fermented wholegrain sourdoughs. J Sci Food Agric [Internet]. 2023 [citado el 14 febrero de 2024];103(15):7683–93. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37452647/
13. Franco W, Pérez-Díaz I, Connelly L, Diaz J. Isolation of exopolysaccharide-producing yeast and lactic acid bacteria from quinoa (*Chenopodium quinoa*) sourdough fermentation. Foods [Internet]. 2020 [citado el 14 febrero de 2024];9(3):337. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/foods9030337
14. Yildirim RM, Arici M. Effect of the fermentation temperature on the degradation of phytic acid in whole-wheat sourdough bread. Lebenson Wiss Technol [Internet]. 2019 [citado el 14 febrero de 2024];112(108224):108224. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.122
15. Rizzello CG, Lorusso A, Montemurro M, Gobbetti M. Use of sourdough made with quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour and autochthonous selected lactic acid bacteria for enhancing the nutritional, textural and sensory features of white bread. Food Microbiol [Internet]. 2016 [citado el 14 febrero de 2024]; 56:1–13. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.018
16. Rosero O, Marounek M, Brenová N, Lukešova D. Phytase activity and comparison of chemical composition, phytic acid P content of four varieties of quinoa grain (*Chenopodium quinoa* Willd.). Acta Agron [Internet]. 2013 [citado el 14 febrero de 2024]; 62(1):13–20. Disponible en: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169929770004
17. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego [MINAGRI]. Análisis de Mercado

Quinua 2015-2020 [Internet]. Lima: MINAGRI 2020 [citado el 16 de febrero 2024]; 1-63. Disponible en: https://repositorio.midagri.gob.pe/handle/20.500.13036/1261?mode=full

18. Song J, Yan Y, Wang X, Li X, Chen Y, Li L, et al. Characterization of fatty acids, amino acids and organic acids in three colored quinoas based on untargeted and targeted metabolomics. Lebenson Wiss Technol [Internet]. 2021 [citado el 16 de febrero 2024];140(110690):110690. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110690
19. Vargas P, Arteaga R, y Cruz L. (2019). Análisis bibliográfico sobre el potencial nutricional de la quinua (*Chenopodium quinoa*) como alimento funcional. Centro Azúcar. [Internet] 2019 [Citado el 16 de febrero del 2024]; 46(4), 89-100. Disponible en: Epub 01 de diciembre de 2019. Recuperado en 19 de junio de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612019000400089&lng=es&tlng=es.
20. Ceyhun Sezgin A, Sanlier N. A new generation plant for the conventional cuisine: Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Trends Food Sci Technol [Internet]. 2019 [citado el 16 de febrero 2024]; 86:51–8. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.039
21. Apaza V, Cáceres G, Estrada R, Pinedo R. Catálogo de variedades comerciales de quinua en el Perú [Internet]. Lima: Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA y Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO 2013 [citado el 16 de febrero 2024]; 79. Disponible en: http://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/76.
22. Gómez L, Aguilar E. Guía de cultivo de quinua. [Internet]. Lima: ©FAO y Universidad Nacional Agraria La Molina 2016 [citado el 16 de febrero 2024];(2):27-31Disponible en https://www.fao.org/3/i5374s/i5374s.pdf.
23. Pedrali D, Giupponi L, Peña R, Villanueva M, y Mateos I. (2022). The quinoa variety influences the nutritional and antioxidant profile rather than the geographic factors. Food Chemistry. [Internet]. 2022 [Citado el 18 de febrero 2024]; 402. 133531. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133531
24. Navia N, Nina G, Mena E, Salcedo O. Hidrólisis enzimática en harina de quinua y tarwi por efecto de α-amilasa. Rev.Bio.Agro [Internet]. 2019 [citado el 18 de febrero 2024]; 17(1): 64-73. Disponible en: https://doi.org/10.18684/bsaa.v17n1.1205.
25. Borges J, Bonomo R, Paula C, Oliveira C, Cesário M. Características físico-químicas, nutricionais e formas de consumo da quinoa (*chenopodium quinoa* willd.) [Internet]. 2019 [citado el 18 de febrero 2024]; 15(1): 9 - 23. Disponible en: https://doi.org/10.21897/rta.v15i1.815
26. Sparvoli F, Cominelli E. Seed Biofortification and Phytic Acid Reduction: A

Conflict of Interest for the Plant? Plants [Internet]. 2015 [citado el 18 de febrero 2024]; 4(4): Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27135349/

27. Martínez B, Ibáñez V, Rincón F. Ácido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. Arco Latinoam Nutr [Internet]. 2002 [citado el 18 de febrero 2024]; 52(3): 219-231. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222002000300001
28. Gupta RK, Gangoliya SS, Singh NK. Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. J Food Sci Technol [Internet]. 2015 [citado el 20 de febrero 2024];52(2):676–84. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s13197-013-0978-y
29. Oh B-C, Choi W-C, Park S, Kim Y-O, Oh T-K. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. 2004 [citado el 20 de febrero 2024];63(4):362–372. Disponible en: https://doi.org/10.1007/s00253-003-1345-0
30. Vashishth A, Ram S, Beniwal V. Cereal phytases and their importance in improvement of micronutrients bioavailability. 3 Biotech [Internet]. 2017 [citado el 20 de febrero 2024]; 7(1): 42. Disponible en: https://doi.org/10.1007/s13205-017-0698-5
31. Singh NK, Joshi DK, Gupta RK. Isolation of Phytase Producing Bacteria and Optimization of Phytase Production Parameters. Jundishapur J Microbiol [Internet]. 2013 [citado el 20 de febrero 2024]; 6(5): 6419. Disponible en: https://doi.org/10.5812/jjm.6419.
32. De Vuyst L, Van S, Leroy F. Microbial Ecology and Process Technology of Sourdough Fermentation. En Advances in Applied Microbiology: Elsevier Inc; 2017 [citado el 20 de febrero 2024]; (100): 49-160. Chapter 2. Disponible en: https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.02.003.
33. Corsetti A, Settanni L. Lactobacilli in sourdough fermentation. Food Research International [Internet]. 2007 [citado el 22 de febrero 2024]; 40: 539–558. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.11.001
34. Falciano A, Romano A, García BE, Regalado C, Di Piero P, Masi P. Effect of the refreshment on the liquid sourdough preparation. Italian Journal of Food Science [Internet]. 2022 [citado el 22 de febrero 2024]; 34(3): 99–104. Disponible en: https://doi.org/10.15586/ijfs.v34i3.2217
35. Gänzle MG. Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. Food Microbiol [Internet]. 2014 [citado el 22 de febrero 2024]; 37:2–10. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.007
36. Wieser H, Vermeulen N, Gaertner F, Vogel RF. Effects of different Lactobacillus and Enterococcus strains and chemical acidification regarding degradation of gluten proteins during sourdough fermentation. Eur Food Res

Technol [Internet]. 2008 [citado el 22 de febrero 2024]; 226(6):1495–502. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s00217-007-0681-1

37. Katina K, Heiniö RL, Autio K, Poutanen K. Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. Lebenson Wiss Technol [Internet]. 2006 [citado el 22 de febrero 2024];39(10):1189–202. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2005.08.001.
38. Yin QQ, Zheng QH, Kang XT. Biochemical characteristics of phytases from fungi and the transformed microorganism. Anim Feed Sci Technol [Internet]. 2007 [citado el 24 de febrero 2024];132(3–4):341–50. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.03.016
39. Jorquera M, Martínez O, Maruyama F, Marschner P, Mora MDLL. Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. Microbes Environ [Internet]. 2008 [citado el 24 de febrero 2024]; 23(3): 182-191. Disponible en: https://doi.org/10.1264/jsme2.23.182
40. Acosta A, Cárdenas M. Enzimas en la alimentación de las aves. Fitasas. Revista Cubana de Ciencia Agrícola [Internet]. 2006 [citado el 24 de febrero 2024]; 40(4): p. 377-387. Disponible en: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193017672001
41. Kaur P, Kunze G, Satyanarayana T. Yeast Phytases: Present Scenario and Future Perspectives. Critical Reviews in Biotechnology [Internet]. 2007 [citado el 24 de febrero 2024]; 27(2): p. 93-109. Disponible en: https://doi.org/10.1080/07388550701334519
42. Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. BioMed research international [Internet]. 2013 [citado el 24 de febrero 2024]; 2013: 1-18. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1155/2013/329121.
43. Heitmanna M, Zanninia E, Arendta E. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* metabolites produced during fermentation on bread quality parameters: a review. Crit Rev Food Sci Nutr [Internet]. 2018 [citado el 26 de febrero 2024]; 58(7): p. 1152-1164. Disponible en 10.1080/10408398.2016.1244153.
44. Menezes AGT, Ramos CL, Cenzi G, Melo DS, Dias DR, Schwan RF. Probiotic potential, antioxidant activity, and phytase production of indigenous yeasts isolated from indigenous fermented foods. Probiotics & Antimicro. Prot [Internet]. 2019 [citado el 26 de febrero 2024]; 12: 280–288. Disponible en: https://doi.org/10.1007/s12602-019-9518-z.
45. Puppala KR, Kumar VR, Khire J, Dharne M. Dephytinizing and probiotic potentials of *Saccharomyces cerevisiae* (NCIM 3662) strain for amelioration of nutritional quality of functional Foods. Probiotics & Antimicro. Prot. [Internet]. 2019 [citado el 26 de febrero 2024]; 11: 604–617. Disponible en: https://doi.org/10.1007/s12602-018-9394-y.

46. Parra R. Review lactic acid bacteria: functional role in the foods. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial. [Internet] 2010 [citado el 26 de febrero 2024]; 8: 93-105. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262755092_REVIEW_LACTIC_ACID_BACTERIA_FUNCTIONAL_ROLE_IN_THE_FOODS
47. Sharma N, Angural S, Rana M, Puri N, Kondepudi KK, Gupta N. Phytase producing lactic acid bacteria: cell factories for enhancing micronutrient bioavailability of phytate rich foods. Trends in Food Science & Technology [Internet]. 2020 [citado el 28 de febrero 2024]; 96: p. 1-12. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.001.
48. Carrizo SL. "Aplicación de bacterias lácticas en el desarrollo de alimentos novedosos a base de granos andinos. [Tesis para optar el grado académico de Doctora en Ciencias Biológicas]. San Miguel de Tucumán: Universidad Nacional de Tucumán; 2018. Disponible en: http://hdl.handle.net/11336/84670.
49. Jagelaviciute J, Cizeikiene D. The influence of non-traditional sourdough made with quinoa, hemp and chia flour on the characteristics of gluten-free maize/rice bread. LWT [Internet]. 2021 [citado el 28 de febrero 2024]; 137: 110457. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110457.
50. Parada RB, Sosa F, Marguet E, Vallejo M. Cambios en la concentración de ácido fítico, fósforo libre y hierro soluble durante la fermentación de repollo blanco y repollo chino. Bionatura [Internet]. 2020 [citado el 28 de febrero 2024]; 7(2): 1-6. Disponible en: http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.02.3.
51. Reale A, Mannina L, Tremonte P, Sobolev A, Succi M, Sorrentino E, & Coppola R. Phytate degradation by lactic acid bacteria and yeasts during the wholemeal dough fermentation: a 31P NMR study. Journal of agricultural and food chemistry [Internet]. 2004 [citado el 2 de marzo 2024]; 52(20): 6300–6305. Disponible en: https://doi.org/10.1021/jf049551p
52. Van Rossum T, Ferretti P, Maistrenko OM, Bork P. Diversity within species: interpreting strains in microbiomes. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2020 [citado el 2 de marzo 2024]:18(9):491–506. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-0368-1
53. Suryani AE, Anggraeni AS, Lusty I, Damayanti E, Karimy MF. Isolation and identification of phytate-degrading yeast from traditional fermented food. Biodiversitas [Internet]. 2021 [citado el 4 de marzo 2024]; 22(2): 866-873. Disponible en: https://doi.org/10.13057/biodiv/d220241.
54. Cepeda L, Ledesma G, Velázquez V. Una esperanza para las donaciones universales: conversión de sangre tipo A a sangre tipo O. AEBMedicine [Internet]. 2023 [citado el 4 de marzo 2024];1(1):20-3. Disponible en: https://aebmedicine.com/index.php/aebmedicine/article/view/7877
55. Suárez C, Garrido N, Guevara C. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la

producción de alcohol. Revisión bibliográfica. ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar [Internet]. 2016 [citado el 4 de marzo 2024];50(1):20-22. Recuperado de: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420004

56. León P, Montoya O, Motato K, Granda D, Caro C, Restrepo J. et al. Bacterias ácido lácticas (BAL) silvestres colombianas presentan propiedades adecuadas para la fabricación de masa ácida. Vitae [Internet]. 2006 [citado el 4 de marzo 2024]; 13(2): 27. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042006000200004&lng=en.
57. Estrada G, Ramírez M. Hongos de importancia clínica. Castaño C. Micología General. Manizales: Universidad Católica de Manizales; 2019.p. 141. Disponible en: https://repositorio.ucm.edu.co/handle/10839/2654
58. Tehri N, Kumar N, Raghu HV, Vashishth A. Biomarkers of bacterial spore germination. Ann Microbiol [Internet]. 2018 [citado el 4 de marzo 2024];68(9):513–514. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s13213-018-1361-z
59. Sánchez J, Atencio L, Pérez J, Dupuy O, Díaz E, Godoy F. Assessment of *Vibrio* populations in a transect of *Rhizophora mangle* in Punta Galeta, Panamá: culture-dependent analyses reveal biotechnological applications. Rev Biol Trop [Internet]. 2023 [citado el 6 de marzo 2024];71(1): e50983. Disponible en: https://doi.org/10.15517/rev.biol.trop..v71i1.50983
60. Moreno L. Estudio de la microflora bacteriana (Vibrionaceae) presente en las fases iniciales de vida de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* [Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias con especialidad en manejo de Recursos Marinos]. México: Instituto Politécnico Nacional Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas; 2004. Disponible en: https://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/14454
61. Martínez C, Ros G, Periago M, López G. Biodisponibilidad del hierro de los alimentos [Internet]. ALAN. 1998 [citado el 6 de marzo 2024]: 49(2): 106-108. Disponible en: https://www.alanrevista.org/ediciones/1999/2/art-3/
62. Suleiman N, García R, Narbona I, Domínguez G. Proyecto Lázaro (2016): de la criopreservación celular a humana. Mito y realidad para la formación docente en el área de Ciencias de la Salud. Rev Med Cine [Internet]. 2022 [citado el 6 de marzo 2024];18(3):193-204. Disponible en: https://dx.doi.org/10.14201/rmc.27412.
63. Calvert MD, Madden AA, Nichols LM, Haddad NM, Lahne J, Dunn RR, et al. A review of sourdough starters: ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research. PeerJ [Internet]. 2021 [citado el 10 de marzo 2024];9(e11389): e11389. Disponible en: https://doi.org/10.7717/peerj.11389
64. Man-Jin I,Sung-Won S, Nam-Soon O. Fermentative production and

application of acid phytase by Saccharomyces cerevisiae CY strain. African J Biotechnol [Internet].2008 [citado el 10 de marzo 2024]; 7(17):3115–20. Recuperado a partir de: https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59237

65. Pantoja L, Prieto G, Aguirre E. Caracterización de la harina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y la harina de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) para su industrialización. Revista Taya Caja [Internet]. 2020 [citado el 16 de marzo 2024]; 3(1): p. 76-83. Disponible en: https://doi.org/10.46908/rict.v3i1.72.
66. Dussán S, Hurtado D, Camacho J. Granulometría, propiedades funcionales y propiedades de color de las harinas de quinua y chontaduro. CIT Inform Tecnol [Internet]. 2019 [citado el 20 de marzo 2024];30(5):3–10. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642019000500003
67. Mu J, Qi Y, Gong K, Chen Z, Brennan MA, Ma Q, et al. Effects of quinoa flour (Chenopodium Quinoa Willd) substitution on wheat flour characteristics. Curr Res Food Sci [Internet]. 2023 [citado el 22 de marzo 2024];7(100556):100556. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100556
68. Assosation of Official Agricultura Chemists N°943.02 Potentiometric. [Arlintong, VI, USA]. Methods of Analysis of A.O.A.C International. 16 ed. Arlintong, 1995. v.2, cap. 32, p. 1-43
69. INDECOPI. NTP 205.039. Determinación de titulable en harinas. [Internet]. Perú. 1975 [citado el 26 de marzo 2024]. Disponible en: https://www.deperu.com/normas-tecnicas/NTP-205-039.htmL
70. Meza, B., Magali, Y., Mallma, C., & Lesli, F. Caracterización fisicoquímica, fitoquímica y funcional de la harina de Khaya y Oca (*Oxalis tuberosa*) para uso industrial. [Título para Ingeniería Alimentaria]. Huancayo; repositorio.uncp: Universidad Nacional del Centro del Perú; 2017. Disponible en: http://hdl.handle.net/20.500.12894/1221
71. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.Thirteenth edition, 1980. William Horwitz, Editor. Chapter 14. P. 213.
72. Association of Official Analytical Chemists [AOAC]. 16.023 Titratable acidity. In AOAC Official Methods of Analysis. 1984;14th ed.
73. Robles H, Miranda H, Lora C. Aislamiento de levaduras productoras de etanol a partir de chicha de jora del Mercado “Mayorista”de Trujillo (Perú). REBIOL [Internet] 2012 [citado el 2 de abril 2024]; 32(2):48-55. Disponible en: http://creativecommons.org/licenses/by-ns-sa/2.5/pe
74. Quintero M, Montoya D, Restrepo D, González D. Conservación de bacterias por liofilización en la colección de microorganismos CM-EM-UDEA, Medellín,

Colombia. Biota colombiana [Internet]. 2023 [citado el 4 de abril 2024]; 24(2):e1127. Disponible en: https://doi.org/10.21068/2539200x.1127.

75. Palacios JR, Rivas EA. Aislamiento y caracterización de bacterias acidolacticas (BAL) obtenidas de *Oreochromis niloticus* (Tilapia) cultivadas en jaulas flotantes en el Lago de Ilopango El Salvador. [Tesis para optar el título profesional de Licenciado En Qumíca y Farmacia]. El Salvador: Universidad del Salvador; 2019.Disponible en: https://ri.ues.edu.sv/.
76. Mukesh P, Suma S, Singaracharya MA, Lakshmipathi V. Isolation of phytate-hydrolysing microbial strains from traditional wastewater of rice fermentation and liquid cattle feeds. World J Microbiol Biotechnol [Internet]. 2004 [citado el 6 de abril 2024];20(5):531–4. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1023/b:wibi.0000040403.23667.68
77. Mateo J, Garcerá P, Maicas S. Unusual Non-Saccharomyces Yeasts Isolated from Unripened Grapes without Antifungal Treatments [Internet]. 2020 [citado el 8 de abril 2024]; 6(2): p. 41. Disponible en: https://doi.org/10.3390/fermentation6020041.
78. LaTorre I. Caracterización bioquímica y tecnológica de cepas ácido lácticas aisladas de leche cruda de oveja en el proceso de elaboración de queso artesano de Teruel. [Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Técnico Industrial]. Zaragoza: Universidad de Zaragoza, 2011.Disponible en https://zaguan.unizar.es/record/5967?ln=es#.
79. Darambazar, E. Method of phytic acid determination in food, feed, and plant materials. Assay protocol. [Internet] Canada: University of Saskatchewan; 2018: 4. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/335664977_Method_of_Phytic_Acid_Determination_in_Food_Feed_and_Plant_Materials_Assay_Protocol
80. Mikulski D, Kłosowski G. Evaluation of phytic acid utilization by *S. cerevisiae* strains used in fermentation processes and biomass production. J Basic Microbiol. [Internet] 2017 [citado el 10 de abril 2024];57(1):87–91. Disponible en: https://doi.org/10.1002/jobm.201600311
81. Gao Y, Shang C, Saghai MA, M. BR, A GE, P. K, et al. A Modified Colorimetric Method for Phytic Acid Analysis in Soybean. Crop Science [Internet]. 2007 September 01 [citado el 12 de abril 2024];]; 47(5): p. 1797-1803. Disponible en: https://doi.org/10.2135/cropsci2007.03.0122.
82. INDECOPI. Norma Técnica Peruana. 011.451 GRANOS ANDINOS. Harina de quinua [Internet] Lima; 2013. [Consultado abril 16 del 2024]. 1-8. Disponible en: https://repositorio.promperu.gob.pe/server/api/core/bitstreams/26e1779a-f4cb-4279-87d4-48d9ece72955/content
83. Wang Y, Wu J, Lv M, Shao Z, Hungwe M, Wang J, et al. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food

industry. Front Bioeng Biotechnol [Internet]. 2021 [citado el 22 de abril de 2024];9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285

84. Minervini F, De Angelis M, Di Cagno R, & Gobbetti M. Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. International Journal of Food Microbiology, [Internet] 2014 [citado el 20 de abril 2024];171, p. 136–146. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.021
85. Chiş MS, Păucean A, Man SM, Vodnar DC, Teleky B-E, Pop CR, et al. Quinoa sourdough fermented with Lactobacillus plantarum ATCC 8014 designed for gluten-free muffins—A powerful tool to enhance bioactive compounds. Appl Sci (Basel) [Internet]. 2020 septiembre [citado el 24 de abril de 2024];10(20):7140. Disponible en: https://www.mdpi.com/2076-3417/10/20/7140
86. Li Z, Zhou M, Cui M, Wang Y, & Li H. Improvement of whole wheat dough fermentation for steamed bread making using selected phytate-degrading Wickerhamomyces anomalus P4. Journal of Cereal Science [Internet]. 2021 junio [citado el 26 de abril de 2024]; 100, p. 103261. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103261
87. Anastasio M, Olimpia P, Cirillo T, Palomba S, Blaiotta G, Villani F. Selection and Use of Phytate-Degrading LAB to Improve Cereal-Based Products by Mineral Solubilization During Dough Fermentation. Food Sci [Internet]. 2010 [citado el 28 de abril de 2024]; 75(1), p:M28-35. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01402.x
88. Konietzny U, Greiner R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). Int J Food Sci Technol [Internet]. 2002 [citado el 28 de abril de 2024];37(7):791–812. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00617.x

X. ANEXOS

Anexo 1: Certificado taxonómico de quinua negra

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. 3796
CEL: 963689079
EMAIL: JOCAMDE@GMAIL.COM

CERTIFICACION DE IDENTIFICACION BOTANICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO. CBP 3796 – INSCRITO EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIONES DE IDENTIFICACION TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA – RESOLUCIÓN DIRECTORAL N.º 0311-2013- MINAGRI-OGFFS-OGEFFS.

CERTIFICA:

Que, **YESICA YENI HUAROC CANCHARI** y **GINA SMITH INGA LEVIZACA**, con grado académico de Bachiller, egresadas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Escuela profesional de Farmacia y Bioquímica. Con fines de investigación han solicitado la identificación y certificación botánica de una muestra de quinua procedente del departamento de Puno, lugar de producción: SALCEDO-PUNO, donde es cultivada por INIA como cultivar INIA 420 NEGRA COLLANA; la muestra de semillas ha sido identificada como ***Chenopodium quinoa* Willd.** Según la base de datos de W^{3}Tropicos del Missouri Botanical Garden que sigue el sistema moderno de clasificación de las angiospermas (APG), publicado en 1998 por el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas, revisado por APG II (2003), APG III (2009) y APG IV (2016), el sistema APG evita el uso de la nomenclatura taxonómica clásica por arriba de orden. Mark W. Chase & James L. Reveal en APG III (2009) consideran a todas las plantas verdes en la Clase Equisetopsida. Teniendo en cuenta los datos de la base de W^{3}Tropicos, la especie identificada tiene las siguientes categorías taxonómicas y clados:

Reino: Plantae
División: Angiospermae
Clase: Equisetopsida
Subclase: Magnoliidae
Superorden: Caryophyllanae
Orden: Caryophyllales
Familia: Amaranthaceae
Género: Chenopodium
Especie: *Chenopodium quinoa Willd.*

Cultivar: INIA 420 NEGRA COLLANA

Nombre vulgar: quinua negra

Se expide la presente certificación con fines de investigación científica.

Lima, 10 de enero del 2023

José R. Campos De La Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jr. Sánchez Silva 156 – Piso 2–Urb. Santa Luzmila –Lima 07 -Lima

Anexo 2: Certificado taxonómico de quinua amarilla.

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. 3796
CEL: 963689079
EMAIL: JOCAMDE@GMAIL.COM

PLANTAS DEL PERÚ - CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

CERTIFICACION DE IDENTIFICACION BOTANICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO. CBP 3796 – INSCRITO EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIONES DE IDENTIFICACION TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA – RESOLUCIÓN DIRECTORAL N.º 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

Que, **YESICA YENI HUAROC CANCHARI Y GINA SMITH INGA LEVIZACA**, con grado académico de Bachiller, egresadas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Escuela profesional de Farmacia y Bioquímica. Con fines de investigación han solicitado la identificación y certificación botánica de una muestra de quinua procedente del departamento de Puno, lugar de producción ILLPA-Puno, donde es cultivada por INIA como cultivar **Kancolla**; la muestra de semillas ha sido identificada como ***Chenopodium quinoa* Willd.** Según la base de datos de W^3Tropicos del Missouri Botanical Garden que sigue el sistema moderno de clasificación de las angiospermas (APG), publicado en 1998 por el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas, revisado por APG II (2003), APG III (2009) y APG IV (2016), el sistema APG evita el uso de la nomenclatura taxonómica clásica por arriba de orden. Mark W. Chase & James L. Reveal en APG III (2009) consideran **a todas las** plantas verdes **en la** Clase Equisetopsida. Teniendo en cuenta los datos de la base de **W^3Tropicos**, **la especie identificada** tiene las siguientes categorías taxonómicas y clados:

Reino: Plantae
División: Angiospermae
Clase: Equisetopsida
Subclase: Magnoliidae
Superorden: Caryophyllanae
Orden: Caryophyllales
Familia: Amaranthaceae
Género: Chenopodium
Especie: *Chenopodium quinoa Willd.*

Cultivar: KANCOLLA

Nombre vulgar: quinua amarilla

Se expide la presente certificación con fines de investigación científica.

Lima, 10 de enero del 2023

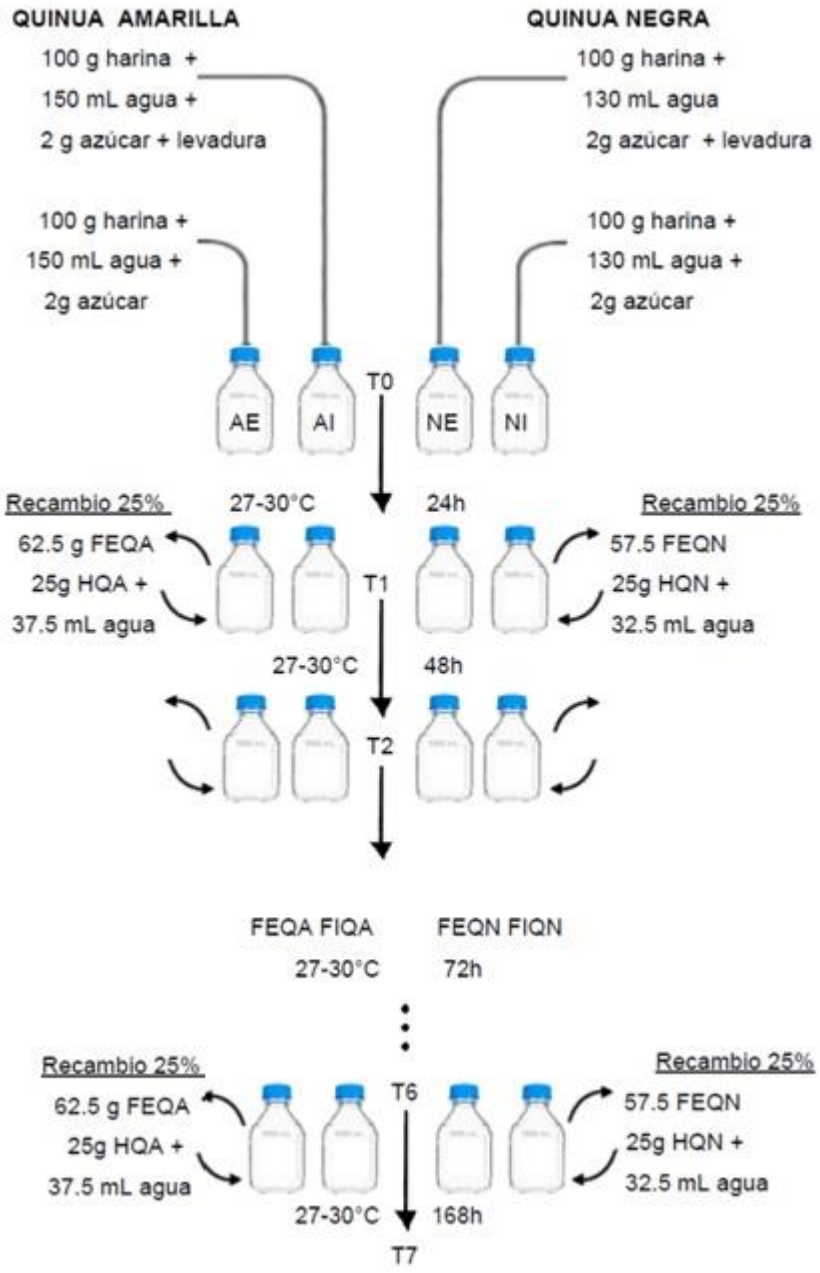
José R. Campos De La Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jr. Sánchez Silva 156 – Piso 2–Urb. Santa Luzmila –Lima 07 -Lima

Anexo 3: Obtención de la harina de quinua negra y amarilla



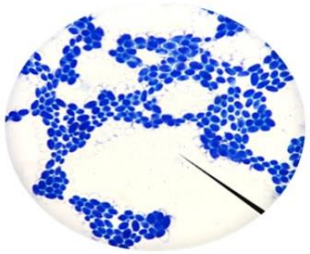
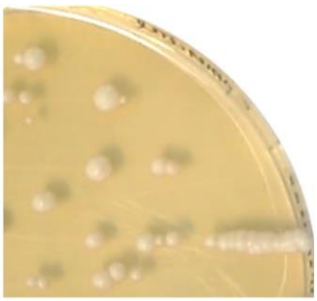
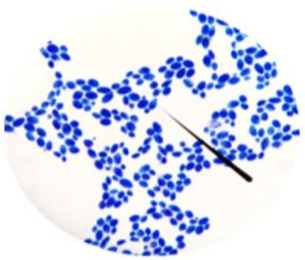
Anexo 4: Flujograma de la obtención de masas madre de quinua negra y amarilla

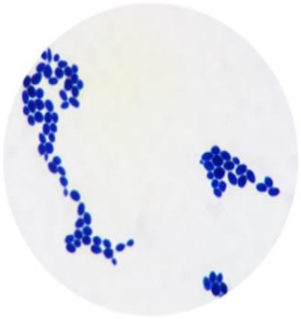
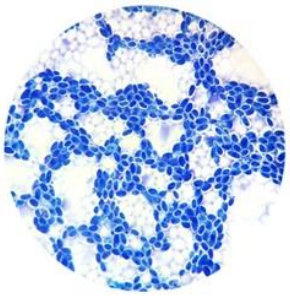
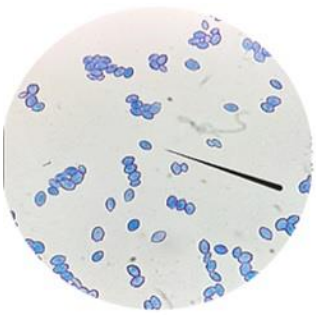
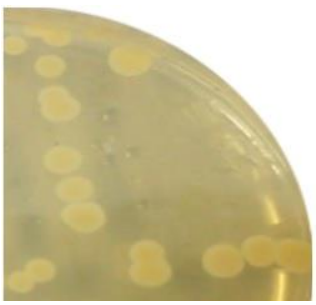
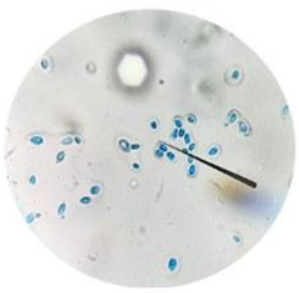


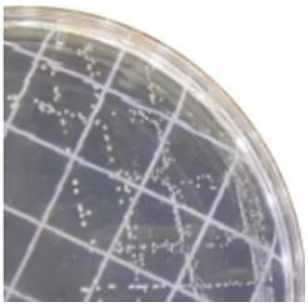
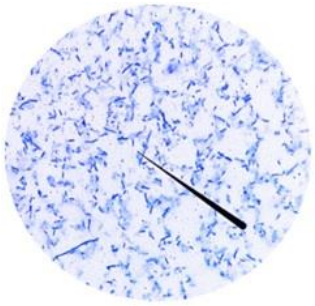
Anexo 5: Obtención de masas madre de harina de quinua negra y amarilla



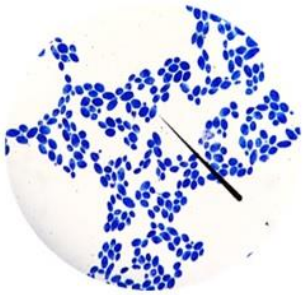
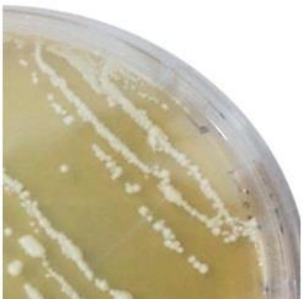
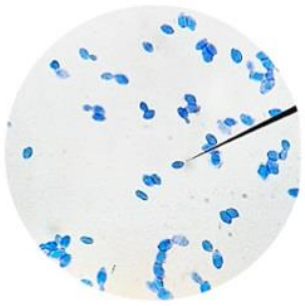
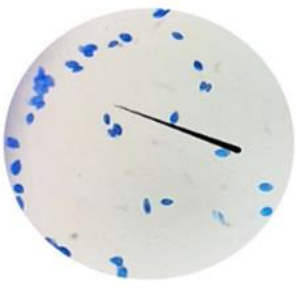
Anexo 6: Caracterización macroscópica y microscópica de levaduras y BAL aisladas de masas madre durante la FEQN

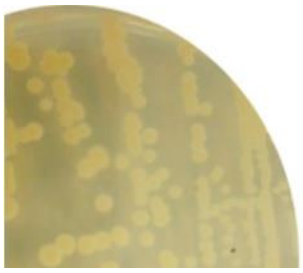
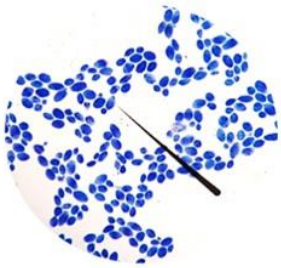
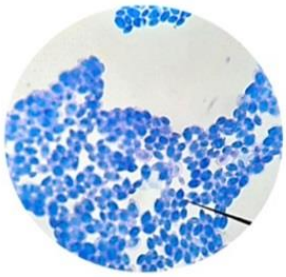
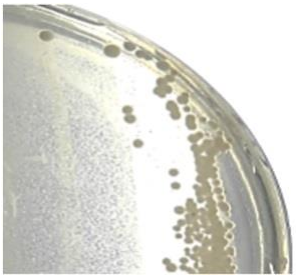
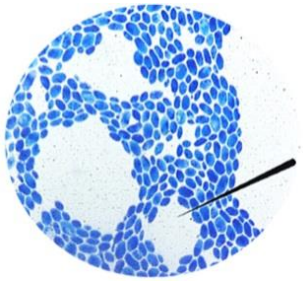
Código asignado	Especie	Fotografía de colonias	Fotografía de células
QNO24H	*Saccharomyces cerevisiae*		
QN1CG´72H	*Saccharomyces cerevisiae*		
QNC72H			
QNN´´72H			
QNL72H			
QN2CG168H	*Saccharomyce cerevisiae*		

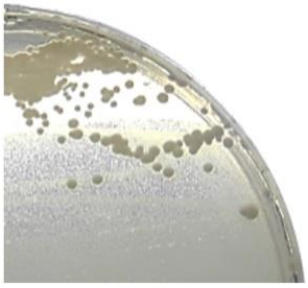
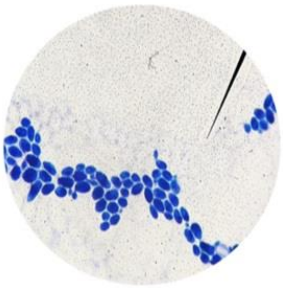
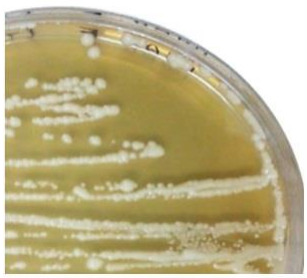
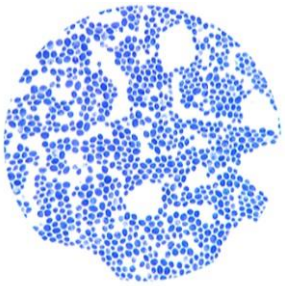
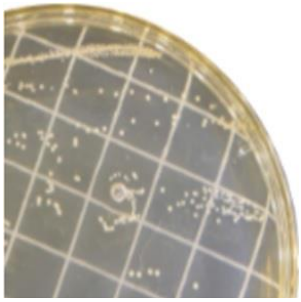
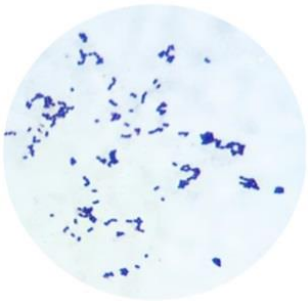
QNA168H			
QNM´72H QN1CG72H	*C.pelliculosa* *(W. anomalus)*		
QNB168H	*C.pelliculosa* *(w. anomalus)*		
QNP´´24H QNF24H	*Candida colliculosa* *(Toralospura* *Delbrueckii)*		
QNM´´24H	*Candida krusei* *(Pichia kudriavsevii)* *(Issatchenkia orientalis)*		

QNA72H	*Lactobacillus plantarum*		

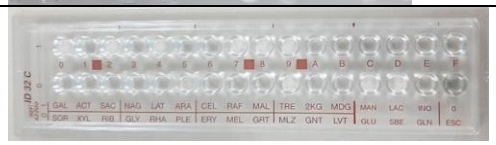
Anexo 7: Caracterización macroscópica y microscópica de levaduras y BAL aisladas de masas madre durante la FEQA.

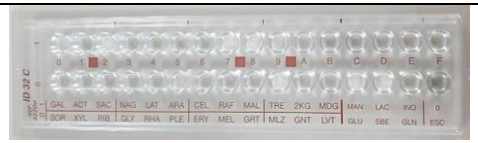
Código asignado	Especie	Fotografía de colonias	Fotografía de células
QAY´24H	Candida holmii *(Saccharomyces exiguus* *Kasachstania exiguus)*		
QAθ24H	*Candida kefyr* *Kluyveroimyces marxianus*		
QAE´48H			

QAB24H	*Candida krusei*		
QAA´72H	*Saccharomyces cerevisiae*		
QAE´´72H			
QAC168H			
QAY´´72H	*Candida pelliculosa*		
QAX72H			
QAI72H			
QAA168H			

QA¨C¨168H			
QA¨B¨168H	*Candida guilliermondii*		
QAC72H	*Lactobacillus plantarum*		

Anexo 8: Identificación mediante API de cepas seleccionadas de masas madre de harina de quinua negra y amarilla.

Cepas codificadas	Galerías API 20C AUX, 32C Y 50CHL	Identificación APIWEB
QN C T8		**PERFIL DUDOSO** Galería: API 20 C AUX V5.0 Perfil: 0 0 4 4 0 7 7 Nota: ¡ID NO VALIDA ANTES DE 72 H DE INCUBACION ! Taxón significativo: Saccharomyces cerevisiae 2 — % ID: 98.9 — T: 0.52 — Pruebas en contra: GLU 100%, HYPH 25%
QN 10-6 2CG T4		**MUY BUENA IDENTIFICACION** Galería: API 20 C AUX V5.0 Perfil: 6 4 4 5 0 7 7 Nota: Taxón significativo: Candida pelliculosa — % ID: 99.0 — T: 0.32 — Pruebas en contra: INO 0%
QN L 72H		**BUENA IDENTIFICACION** Galería: ID 32 C V4.0 Perfil: 5 2 6 1 0 4 0 1 0 3 Nota: ¡ID NO VALIDA ANTES DE 48 H DE INCUBACIÓN ! Taxón significativo: Saccharomyces cerevisiae — % ID: 98.6 — T: 0.43 — Pruebas en contra: MLZ 15%, SBE 1%
QN M' 72 H		**BUENA IDENTIFICACION** Galería: ID 32 C V4.0 Perfil: 4 2 6 4 3 1 1 0 1 1 Nota: Taxón significativo: Candida pelliculosa — % ID: 99.8 — T: 0.28 — Pruebas en contra: TRE 97%, PLE 96%, MLZ 96%
QN A 12-03		**IDENTIFICACION ACEPTABLE** Galería: API 50 CHL V5.2 Perfil: ----++----++++-+--+-+++---+++++++------+---------- Nota: Taxón significativo: Lactobacillus plantarum 1 — % ID: 97.6 — T: 0.24 — Pruebas en contra: SOR 78%, AMY 94%, ARB 99%, ESC 99%, MLZ 92%

Cepas codificadas	Galerías API 20C AUX, 32C Y 50CHL	Identificación APIWEB
QA C T9		**MUY BUENA IDENTIFICACION** Galería: API 20 C AUX V5.0 Perfil: 2 0 4 0 0 3 6 Nota: ¡ID.NO VALIDA ANTES DE 72 H DE INCUBACION ! Taxón significativo: Saccharomyces cerevisiae 1 — % ID: 99.0 — T: 0.94
QA "D" T10		**BUENA IDENTIFICACION** Galería: API 20 C AUX V5.0 Perfil: 6 0 4 4 2 7 7 Nota: Taxón significativo: Candida pelliculosa — % ID: 98.0 — T: 0.83
QA E" 72H		**BUENA IDENTIFICACION** Galería: ID 32 C V4.0 Perfil: 5 2 6 1 0 4 0 1 0 3 Nota: ¡ID.NO VALIDA ANTES DE 48 H DE INCUBACIÓN ! Taxón significativo: Saccharomyces cerevisiae — % ID: 98.6 — T: 0.43 — MLZ 15% — SBE 1%
AQ Y" 72H		**BUENA IDENTIFICACION** Galería: ID 32 C V4.0 Perfil: 5 0 6 4 3 5 1 1 1 1 Nota: Taxón significativo: Candida pelliculosa — % ID: 99.5 — T: 0.47 — LAT 96% — TRE 97%
QA C 10-6 11-03		**EXCELENTE IDENTIFICACION** Galería: API 50 CHL V5.2 Perfil: ----++----++++-+--++++++++++++++-++---++------+-- Nota: Taxón significativo: Lactobacillus plantarum 1 — % ID: 99.9 — T: 0.94

Anexo 9: Imagen de realización de ensayos

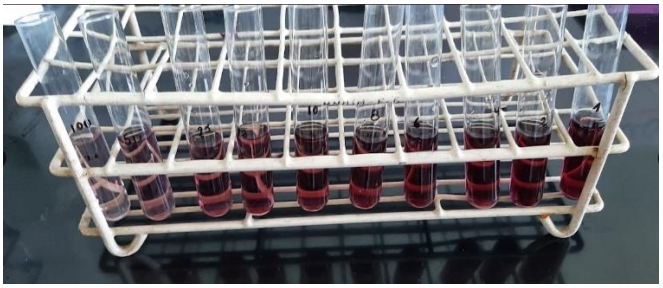
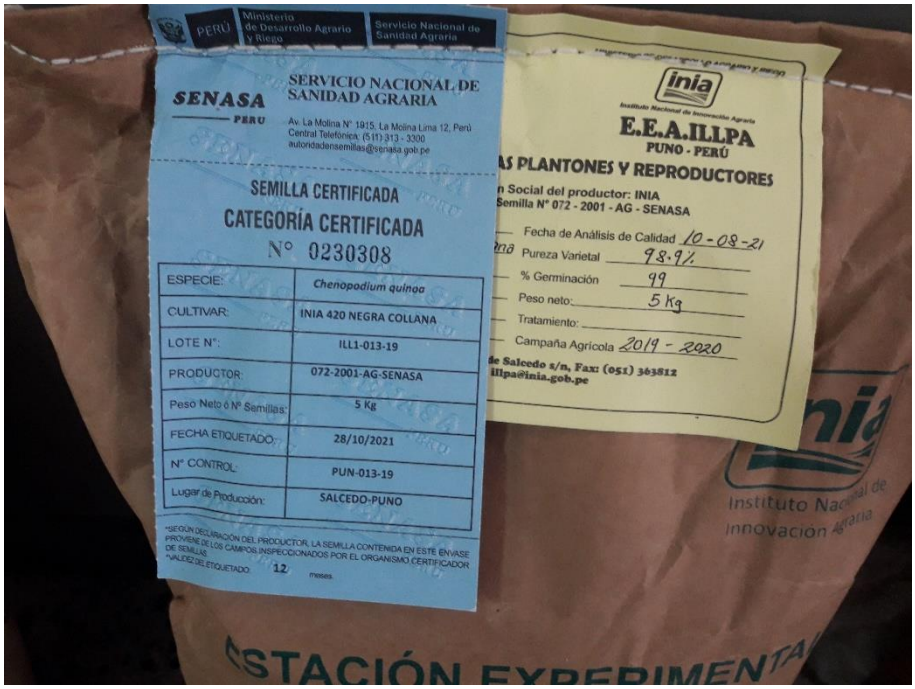


Figura 21. Imagen de la cuantificación de fitatos en masa madre de harina de quinua.



Figura 22. Imagen de tesistas realizando la parte experimental en el laboratorio de Microbiología.

Anexo 10: Certificación de quinua negra Collana por INIA-Puno



Anexo 11: Certificación de quinua amarilla Kancolla por INIA-Puno

