

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS

Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Bioaccesibilidad *in vitro* de compuestos fenólicos presentes en galletas formuladas a base de masas de sorgo fermentadas y su efecto sobre los atributos sensoriales

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

José Luis Valenzuela Gutiérrez

Hermosillo, Sonora

Noviembre de 2020

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Bioaccesibilidad *in vitro* de compuestos fenólicos presentes en galletas formuladas a base de masas de sorgo fermentadas y su efecto sobre los atributos sensoriales

José Luis Valenzuela Gutierrez



Dra. Rosario Maribel Robles Sánchez

Director de la Tesis



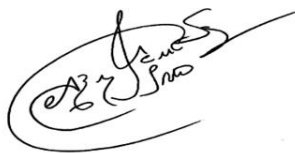
Dra. Ofelia Rouzaud Sánchez

Sinodal



Dra. Guadalupe A. López Ahumada

Sinodal



Dr. Gustavo González Aguilar

Sinodal

Hermosillo, Sonora a 23 de noviembre de 2020.

Asunto: Cesión de derechos

**UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada: Bioaccesibilidad *in vitro* de compuestos fenólicos presentes en galletas formuladas a base de masas de sorgo fermentadas y su efecto sobre los atributos sensoriales, en los sucesivos LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de Maestro en ciencias, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

A T E N T A M E N T E


LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA



Nombre y Firma del Autor

AGRADECIMIENTOS

A Él, por ponerme en este camino y permitirme cumplir mi sueño. Por darme la fuerza en los momentos de debilidad y ser mi guía en este sendero. Por nunca dejarme solo y bendecirme siempre.

A la Universidad de Sonora mi alma mater y al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, por permitirme ser parte de este programa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado para poder llevar a cabo mis estudios de posgrado.

A mi directora de tesis, Dra. Maribel Robles Sánchez, con gratitud y estima porque me ha orientado, apoyado y perfeccionado mi labor, con una gran disposición, entrega y admirable en todo momento.

A los miembros de mi comité: Dra. Guadalupe A. López Ahumada, Dr. Gustavo González Aguilar, Dra. Ofelia Rouzaud Sánchez, por aportarme sus conocimientos para mejorar en el estudio y por el tiempo que recibí de cada uno de ellos para terminar mi maestría.

A mis compañeros de laboratorio, a Alan Ruiz, Daniel Tanory y Maribel Valenzuela, por su apoyo, amistad.

A mi madre Mariza Gutierrez Bernal, por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas, gracias por cada consejo y por cada una de sus palabras que me han guiado durante mi vida y sin duda, no estaría aquí de no ser por usted.

A Josefina Olivas Espinoza y Arturo Ramos Real, por creer en mí y apoyarme en este proyecto y en mi vida, muchas gracias.

DEDICATORIA

A mi prometida María José, que es la persona con la que planeo este escalón de la vida, que es mi gran motivación y promotora del poder haber culminado este trabajo con éxito, te dedico este trabajo a ti quien se preocupó por mí en cada momento. Te agradezco por tanta ayuda y tantos días de débiles y tiempo, no solo para el desarrollo de mi tesis, sino también para mi vida; eres mi inspiración y motivación siempre.

RESUMEN

En sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), predominan los compuestos fenólicos, destacando el ácido ferúlico, el cual ha sido estudiado por su potencial antioxidante, antiinflamatorio, antihipertensivo y anticancerígeno. Dado que el ácido ferúlico se encuentra mayoritariamente ligado o conjugado a algunas estructuras del grano de sorgo, su bioaccesibilidad se ve limitada y por tanto su biodisponibilidad, lo que reduce su potencial biológico. La fermentación ha mostrado resultados significativos en cuanto al incremento de fenoles totales y ácido ferúlico en su forma libre, quedando aun por explorar el comportamiento de estos compuestos en modelos de digestión *in vitro* en productos terminados. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la formulación de galletas con harina de masa de sorgo sometida a dos procesos fermentativos sobre la bioaccesibilidad de fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante, así como su impacto en los atributos sensoriales. Los resultados mostraron que las galletas formuladas con harinas de masas sometidas a fermentación ácido-láctica (con y sin inóculo añadido), presentaron los más altos porcentajes de bioaccesibilidad de fenoles totales y actividad antioxidante en comparación con las galletas control y con las formuladas con harinas de masas sometidas a fermentación alcohólica (con y sin levadura añadida). La bioaccesibilidad del ácido ferúlico se afectó considerablemente para todas las galletas evaluadas; sin embargo, en galletas experimentales la bioaccesibilidad fue mayor respecto a las galletas control. Las galletas formuladas con harinas de masas fermentadas por 48 h (fermentación láctica sin inóculo añadido), y las formuladas con masas sometidas a fermentación alcohólica con levadura añadida (210 min) y sin añadir (150 min), fueron calificadas con valores superiores a 5 (me gusta), sin igualar a las galletas de sorgo control. El procedimiento de fermentación por *backslopping* promueve incrementos importantes en la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y actividad antioxidante; no obstante, los atributos sensoriales en el producto final se afectan negativamente. Es posible que la optimización del procedimiento de *backslopping* en masas de sorgo en cuanto nivel de adición de inóculo y tiempos de fermentación puedan mejorar las características sensoriales del producto final.

ÍNDICE

	Página
APROBACIÓN	ii
CARTA DE SESION DE DERECHOS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	vii
RESUMEN	viii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
INTRODUCCIÓN	12
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	16
Compuestos Fenólicos en Cereales: Sorgo.....	16
Disposición Estructural de Compuestos Fenólicos en la Matriz Alimentaria.....	22
Bioaccesibilidad de Compuestos Fenólicos.....	<u>27</u>
Métodos Tecnológicos Aplicados en Sorgo para Mejorar el Contenido de Ácido Ferúlico.....	29
Procesos Fermentativos en Cereales y su Influencia sobre Compuestos Fenólicos.....	32
Fermentación Ácido-Láctica.....	34
Fermentación con Levadura.....	37
Procesos Fermentativos en Masas de Sorgo para Mejorar su Potencial Biológico.....	40
Antioxidantes como Agentes Terapéuticos contra el Estrés Oxidativo.....	44
HIPÓTESIS	47
OBJETIVOS	48
Objetivo General.....	48
Objetivos Específicos.....	48
MATERIALES Y MÉTODOS	49
Obtención y Preparación de la Muestra.....	49
Procesos de Fermentación.....	49
Fermentación Ácido-Láctica.....	49
Fermentación con Levadura.....	50

Obtención de Extractos Metanólicos.....	51
Determinación de Fenoles Totales.....	51
Determinación de Ácido Ferúlico	52
Evaluación de la Actividad Antioxidante.....	53
Preparación de Galletas de Sorgo.....	53
Ensayo de Digestión Gastrointestinal in vitro.....	55
Fase Digestión Oral	55
Fase Digestión Gástrica.....	56
Fase Digestión Intestinal.....	56
Prueba de Aceptabilidad de Atributos Sensoriales de las Galletas Experimentales.....	57
Análisis Estadístico.....	58
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
Fermentación Ácido-Láctica de Masa de Sorgo.....	60
Fermentación de Masas Alcohólica con Adición de Levadura en Masas de Sorgo.....	67
Bioaccesibilidad de Fenoles Totales, Ácido Ferúlico y Actividad Antioxidante en Galletas Formuladas con Harina de Masas Fermentadas de Sorgo.....	73
Bioaccesibilidad de la Actividad Antioxidante.....	84
Evaluación Sensorial de las Galletas Experimentales.....	86
CONCLUSIONES.....	92
BIBLIOGRAFÍA.....	93

LISTA DE TABLAS

Núm.		Página
1	Principales compuestos bioactivos en cereales de mayor consumo....	19
2	Ácidos hidroxicinámicos en harina integral y salvado de sorgo.....	21
3	Etiquetado de galletas experimentales.....	54
4	Efecto del tiempo de fermentación ácido-láctica por backsloping (FLB) y natural (FLN) sobre el pH en masas de sorgo.....	60
5	Tiempos de fermentación en masas de sorgo que mostraron los valores más altos de fenoles totales y ácido ferúlico.....	74
6	Contenido de fenoles totales y ácido ferúlico con galletas formuladas a partir de harinas de masas fermentadas de sorgo antes y después del proceso de simulación de digestión intestinal <i>in vitro</i>	75
7	Bioaccesibilidad de actividad antioxidante en galletas formuladas de masas de sorgo sometidas a diferentes procesos fermentativos.....	85
8	Índice de aceptabilidad de galletas formuladas a partir de masas fermentadas de sorgo.....	91

LISTA DE FIGURAS

Núm.		Página
1	Estructura del grano de sorgo.....	17
2	Estructura química de ácido ferúlico.....	22
3	Disposición estructural de compuestos fenólicos en la matriz alimentaria.....	24
4	Representaciones de la estructura primaria de la pared celular del material vegetal y la reticulación entre componentes estructurales y compuestos fenólicos.....	26
5	Estructura química de una fracción representativa de un arabinoxilano ferulado.....	27
6	Modelo representativo del proceso de bioaccesibilidad de ácido ferúlico bajo condiciones de digestión gastrointestinal.....	29
7	Posibles mecanismos por los cuales la fermentación de masa fermentada puede influir en la calidad nutricional.....	36
8	Modelo de producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) en grasa acumulada en tejido adiposo asociado al síndrome metabólico.....	45
9	Hoja de respuesta de aceptabilidad de atributos sensoriales.....	58
10	Efecto del tiempo de fermentación ácido-láctica de masas de sorgo sobre el contenido de fenoles totales.....	65
11	Efecto del tiempo de fermentación ácido-láctica de masas de sorgo sobre el contenido de ácido ferúlico.....	66
12	Efecto del tiempo de fermentación ácido-láctica de masas de sorgo sobre la actividad antioxidante.....	67
13	Efecto del tiempo de fermentación de masas de sorgo con y sin levadura añadida sobre el contenido de fenoles totales.....	70
14	Efecto del tiempo de fermentación de masas de sorgo con y sin levadura añadida sobre el contenido de ácido ferúlico.....	71
15	Efecto del tiempo de fermentación de masas de sorgo con y sin levadura añadida sobre actividad antioxidante.....	72
16	Bioaccesibilidad (%) de los fenoles totales de las galletas formuladas con harina de masas sometidas a diferentes procesos fermentativos.....	82
17	Bioaccesibilidad (%) de ácido ferúlico presentes en galletas formuladas con masas sometidas a diferentes procesos fermentativos.....	84

18	Prueba de aceptabilidad de atributos sensoriales en galletas formuladas a partir de masas de sorgo sometidas a fermentación ácido-láctica.....	88
19	Prueba de aceptabilidad de atributos sensoriales en galletas formuladas a partir de masas de sorgo sometidas a fermentación alcohólica.....	89
20	Prueba de intención de compra de galletas experimentales.....	90

INTRODUCCIÓN

Diversos estudios experimentales y clínicos han demostrado que el consumo de cereales ha sido asociado con la reducción en el desarrollo de enfermedades crónicas tales como obesidad, diabetes, enfermedad cardiovascular y algunos tipos de cáncer. Este efecto ha sido atribuido en gran parte a la presencia de compuestos bioactivos en donde el mecanismo de acción se atribuye a la actividad antioxidante de estos compuestos (Fardet, Rock, & Rémésy, 2008; Reicks, Jonnalagadda, Albertson, & Joshi, 2014; Vitaglione, Napolitano, & Fogliano, 2008).

El sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), es un cereal que además de ser fuente importante de nutrientes, también aporta compuestos bioactivos que pueden ser benéficos para la salud (Linda Dykes, 2019; Girard & Awika, 2018; Xiong, Zhang, Warner, & Fang, 2019). En este cereal predominan los compuestos fenólicos y dentro de este grupo destacan los ácidos hidroxicinámicos, en donde el ácido ferúlico ha sido reportado en mayor concentración. Diversos estudios han demostrado el potencial biológico de este ácido fenólico, sobresaliendo de manera importante su actividad antioxidante, antiinflamatoria, antihipertensiva y anticancerígena (Alam, 2019; Naowaboot, Piyabhan, Munkong, Parklak, & Pannangpetch, 2016).

El ácido ferúlico se encuentra en mayor concentración en las capas externas del grano (pericarpio) en donde cumple la función de ligarse a estructuras más complejas para proporcionar rigidez y resistencia a las capas externas (Alam, 2019; Chiremba, Taylor, Rooney, & Beta, 2012). Además, es posible que también existan menores concentraciones de ácido ferúlico libre, conjugado o unidos por interacciones no covalentes a diversas estructuras de la matriz alimentaria.

Lo anterior influye de manera significativa en la bioaccesibilidad de este compuesto fenólico es decir que los procesos de digestión y absorción se puedan ver limitados y por tanto la biodisponibilidad de este compuesto puede no reflejarse en un efecto biológico (Hole et al., 2012; Mateo Anson, van den Berg, Havenaar, Bast, & Haenen, 2009). Diversos estudios han evaluado la bioaccesibilidad de algunos compuestos

bioactivos incluyendo los compuestos fenólicos, y los resultados han sido consistentes en que la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos presentes en frutas es mucho más elevada que la reportada en cereales, lo anterior debido a la alta concentración de compuestos fenólicos en forma libre. En sorgo, los reportes sobre bioaccesibilidad son realmente escasos, no obstante, ha sido demostrado que en el caso del ácido ferúlico puede ser hasta del 1% (Gutiérrez-Grijalva, Ambriz-Pérez, Leyva-López, Castillo-López, & Heredia, 2016).

La evidencia científica ha llevado a demostrar que para incrementar este valor es necesaria la aplicación de diversas tecnologías tales como extrusión (Robin, Théoduloz, & Srichuwong, 2015), cocción húmeda (N'Dri et al., 2013), cocción seca (Cardoso et al., 2015) y rostizado (L. Wu, Huang, Qin, & Ren, 2013), entre otros. Estos procesos han demostrado tener una influencia en el contenido de compuestos fenólicos, y se han observado incrementos significativos de fenoles totales respecto al sorgo sin procesar, y en algunos casos asociados a un incremento en la actividad antioxidante.

Como parte de su dieta básica, algunas poblaciones africanas elaboran alimentos fermentados a base de sorgo en donde la principal finalidad es mejorar la biodisponibilidad de algunos nutrientes e invariablemente el proceso fermentativo llega a modificar de manera importante algunos atributos sensoriales (Chiremba, Taylor, & Duodu, 2009; Olufunmilayo S. Omoba, Taylor, & de Kock, 2015). Sin embargo, ha sido poco explorado el efecto del proceso de fermentación en masas de sorgo sobre el contenido de compuestos fenólicos y el efecto sobre su bioaccesibilidad.

El sorgo presenta de manera natural una carga microbiana interesante que va desde bacterias ácido lácticas del género *Streptococcus* y *Lactobacillus* hasta levaduras, lo que da como resultado procesos fermentativos espontáneos que pueden resultar hasta cierto punto complejos de elucidar (Adebo, 2020; Mohammed, Steenson, & Kirleis, 1991).

Las fermentaciones espontáneas o naturales pueden requerir un mayor tiempo para llegar al punto deseado en el alimento. Además, no existe un control en relación con

la carga microbiana participante, esto pudiera significar desventaja con respecto a las fermentaciones controladas, es decir, aquellas en donde existe la adición de un inóculo puro a quien atribuir el proceso fermentativo y además el tiempo pudiera resultar menor. Sin embargo, esto último conduce a la elevación de costos, en donde la obtención de inóculo puros requiere de equipos especializados para su mantenimiento.

La técnica de backslopping ha sido ampliamente utilizada para la fermentación de masas de sorgo, el cual consiste en utilizar una parte de una masa de harina de sorgo anteriormente fermentada como inóculo inicial para un nuevo proceso de fermentación de masa de harina de sorgo. Básicamente se trata de una fermentación ácido láctica y las ventajas que se han atribuido es que estas fermentaciones pueden ocupar un tiempo menor (Elkhalifa, Schiffler, & Bernhardt, 2004; Falasconi, Fontana, Patrone, Rebecchi, & Morelli, 2020; Yousif & El Tinay, 2001). Este tipo de fermentación es llevada a cabo para la obtención de productos alimenticios de una manera artesanal por muchas poblaciones asiáticas y africanas, sin embargo, existe un gran interés por estudiar sus efectos desde el punto de vista de potencial biológico.

Otro tipo de fermentación que al igual que la anterior ha sido poco explorada en sorgo es la fermentación alcohólica o fermentación con levadura, la cual ha sido universalmente utilizada para la obtención de productos de panificación a base de trigo, y para la producción de bebidas alcohólicas como cerveza y vinos donde la finalidad es la producción de alcohol y CO₂ (Coulibaly, 2018; Garzón, Torres, & Drago, 2019).

Por lo anterior en este estudio se propone evaluar el efecto de la aplicación de dos métodos de fermentación en masas de sorgo sobre la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en un producto galleta. El procedimiento de fermentación ácido-láctica por backslopping y la fermentación alcohólica por adición de levadura en masas de sorgo simulando una fermentación panaria, pueden presentar ventajas en cuanto a menores tiempos de fermentación con relación a fermentaciones usando inóculos puros o fermentaciones naturales. Las masas de sorgo poseen el sustrato y componentes bioactivos, mientras que los microorganismos

involucrados en ambos tipos de fermentación (bacterias ácido lácticas y levaduras) poseen las enzimas endógenas y mecanismos bioquímicos que pudieran conducir al incremento de compuestos bioactivos. Lo anterior pudiera justificar la inclusión de sorgo como parte de dietas saludables.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El sorgo pertenece a la familia de las gramíneas, sus características anatómicas y composición química son muy similares a las del trigo, avena, cebada y particularmente el sorgo comparte mayor similitud con el maíz (Dlamini, Taylor, & Rooney, 2007; Perdon & Holopainen-Mantila, 2020).

En la Figura 1, se representa la composición anatómica del grano de sorgo, y es posible distinguir tres partes distintivas: germen (9%) en el cual se concentran los componentes químicos que darán origen a la nueva planta, endospermo (84%) constituido principalmente por almidón y proteína y pericarpio (7%), comúnmente denominado salvado, esta capa se encuentra dividida en tres partes histológicas que son: epicarpio, mesocarpio y endocarpio (Dlamini et al., 2007; Hwang, Cuppett, Weller, & Hanna, 2002). En el pericarpio se encuentra concentrada la fibra dietaria constituida por polisacáridos no amiláceos, celulosa y lignina. Además, esta parte anatómica ha venido siendo de gran interés su estudio, debido a que aquí es donde se encuentra la mayor concentración de compuestos fenólicos.

Compuestos Fenólicos en Cereales: Sorgo

Los cereales comparten muchas de sus características anatómicas todos poseen germen, endospermo y pericarpio. La composición química de estas partes anatómicas es lo que puede diferenciar a un cereal de otro. En años recientes los cereales han sido investigados en relación con su potencial uso en el desarrollo de alimentos funcionales, y los componentes a los cuales se les puede atribuir actividad biológica pueden ser de diferente naturaleza química. Pero, además, el potencial biológico también lo puede definir su ubicación en el grano, las posibles interacciones que puedan existir con otros componentes del grano, así como la farmacocinética que siguen una vez consumidos. Algunos estudios han demostrado de manera relevante el potencial biológico de cereales como trigo (Coda, Giuseppe, Antonio, Poutanen, & Katina, 2014; Villalva et al., 2018), maíz (Zheng et al., 2015), cebada (Seo et al., 2015; Singh & Sneh, 2017) y sorgo (Dlamini et al., 2007; G. Wu et al., 2017).

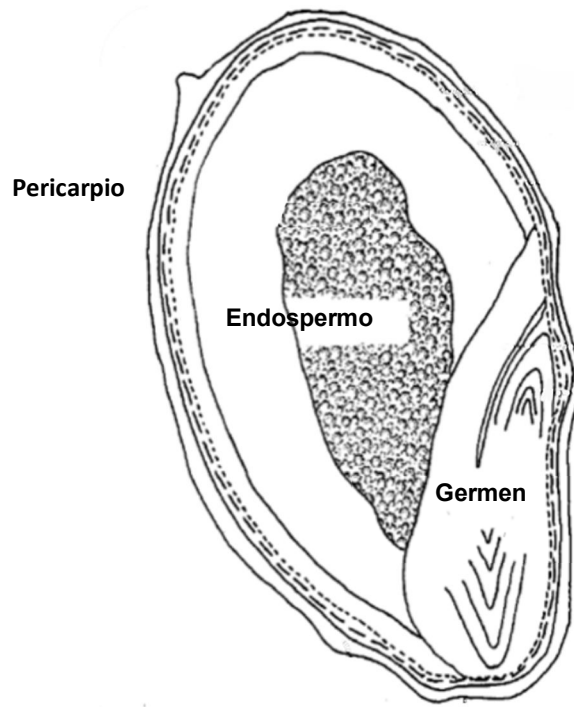


Figura 1. Estructura del grano de sorgo.

Fuente: (Suhendro et al., 2000).

En la Tabla 1, se muestra el contenido de algunos de los compuestos bioactivos presentes en cereales de mayor consumo. Los compuestos fenólicos son predominantes en cereales, y de acuerdo con la tabla se muestra en orden descendente sorgo>trigo>maíz>arroz>centeno>cebada>mijo>avena. No obstante, es relevante mencionar que los compuestos fenólicos, al igual que otras microestructuras y nutrientes presentes en alimentos, pueden estar estructuralmente dispuestos de diferentes formas: ya sea libres, ligadas covalentemente, conjugadas, atrapados físicamente en la matriz alimentaria o unidos mediante fuerzas electrostáticas (Adom & Liu, 2002; Chiremba, Rooney, & Beta, 2012; Stratil, Klejdus, & Kubáň, 2007).

Lo anterior puede conducir a que los contenidos reportados en los estudios de compuestos fenólicos pueden ser muy variables, y dependiendo también del sistema de extracción utilizado para la cuantificación, los valores pueden ser de igual manera muy variables. Por ejemplo, extracciones metanólicas acuosas aseguran la solubilización de compuestos fenólicos libres, mientras que extracciones mediante hidrólisis alcalina/ácida pueden inducir el rompimiento de enlaces covalentes y/o glucosídicos entre los fenoles y otras estructuras y así liberarlos y posteriormente solubilizarlos en metanol (Mateo Anson, van den Berg, Havenaar, Bast, & Haenen, 2009; Salazar-López et al. 2016; Vitaglione, Napolitano, & Fogliano, 2008).

Los compuestos antioxidantes en el sorgo están concentrados en las capas más externas del grano (pericarpio-testa) (Dykes & Rooney, 2007). Aun cuando la separación del endospermo del salvado asegura una mayor concentración de estos compuestos bioactivos, es deseable mantenerlos en la matriz integra (grano entero) debido a que así es como comúnmente se consume este cereal.

Particularmente hablando de compuestos bioactivos con actividad antioxidante, se sabe que el modo de actuar de estos compuestos es a través de captación de radicales libres, como agentes reductores, agentes quelantes y desactivadores de la formación de oxígeno singulete entre otros (Awika, Rooney, Wu, Prior, & Cisneros-Zevallos, 2003).

Tabla 1. Principales compuestos bioactivos en cereales de mayor consumo.

Tipo de Cereal	Tocoferol y tocotrienol	Ácido Ferulico	Carotenoides	Polifenoles
	mg/100 g			mgEAG/g
Trigo	1.4	10-198	20-265	70-1459
Maiz (amarillo, blanco y azul)	6.6	177	969-1300	39-711
Arroz (café y negro)	1.9	30	14-77	54-313
Avena	1.8	7-30	31.0	9.0-34.0
Cebada	2.2	36-62	15-105	50-196
Centeno	4.1	79-102	--	125-255
Sorgo (blanco, amarillo y bicolor)	1.1	9.0	20-22	100-2300
Mijo (grano pelado)	4.0	29.0	74-80	29-47

Fuente: Dykes & Rooney, 2007

Varios estudios han reportado el potencial antioxidante del sorgo atribuido a antocianidinas, quinonas, flavonoles, flavonas, flavanonas y ácidos fenólicos (Awika et al., 2003; Chandrasekara & Shahidi, 2010; Fardet et al., 2008). Los ácidos fenólicos predominantes en cereales son el ácido caféico, ácido p-coumárico, ácido ferúlico y ácido sinápico, los cuales pueden encontrarse en concentraciones variables y de forma libre, ligada o conjugada.

En un estudio llevado a cabo por Salazar-López et al., (2017), se determinó el contenido de los ácidos hidroxicinámicos predominantes en sorgo (libres y ligados) en harina integral y salvado de sorgo, encontrando que el ácido ferúlico fue el ácido predominante tanto libre como ligado, así como también demostró que el mayor contenido de este ácido se encontró en salvado (Tabla 2).

Una de las funciones más importantes de los ácidos fenólicos, especialmente los derivados del ácido hidroxicinámico, es su actividad antioxidante, que depende principalmente del número de grupos hidroxilo y metoxi unidos al anillo de fenilo (Aguilar-Hernández et al., 2017; Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Vila, & Bravo, 2014).

En la Figura 2, se muestra la estructura del ácido ferúlico, su nombre sistemático es 3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico, generalmente existe como el isómero trans, su masa molecular es de 194.0 g/mol y su punto de fusión es de 174°C (Graf, 1992; Srinivasan, Sudheer, & Menon, 2007; Tsao, 2010).

El ácido ferúlico pertenece al grupo de los ácidos hidroxicinámicos o fenilpropanoides (C₆-C₃) están formados básicamente por un anillo aromático, un grupo alifático y un ácido carboxílico en el extremo. Son denominados hidroxicinámicos por poseer un grupo (OH⁻) en el anillo aromático, a lo cual se le atribuye en gran medida su actividad antioxidante en sistemas biológicos (Graf, 1992; Mancuso & Santangelo, 2014).

Tabla 2. Ácidos hidroxicinámicos en harina Integral y salvado de sorgo.

Sorgo	Caféico	ρ -Coumárico	Ferúlico	Sinápico	Fenoles Totales
	$\mu\text{g/g}$				$\mu\text{gEAG/g}$
Extractos metanólicos					
Harina integral	10.2 \pm 1.0	18.1 \pm 1.8	12.2 \pm 0.2	2.1 \pm 0.0	784.3 \pm 29.2
Salvado	14.8 \pm 0.5	8.6 \pm 0.4	19.6 \pm 0.4	3.4 \pm 0.1	2022.2 \pm 31.4
Extractos alcalinos					
Harina integral	ND	38.7 \pm 0.2	679.6 \pm 12.3	ND	2107.9 \pm 40.3
Salvado	ND	169.3 \pm 3.5	3036.0 \pm 87.5	ND	7425.3 \pm 318.7

Fuente: Salazar-López et al. (2017)

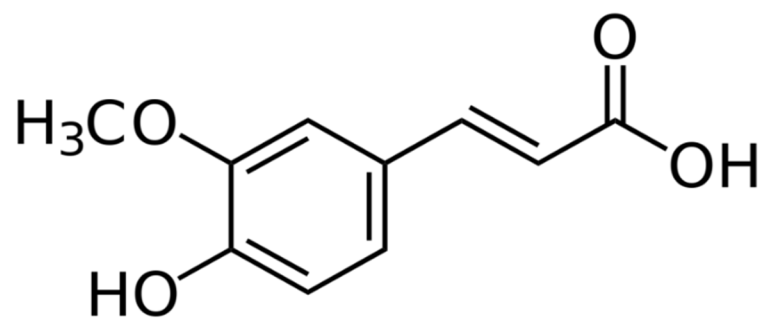


Figura 2. Estructura química de ácido ferúlico.

Fuente: Srinivasan et al. (2007)

Disposición Estructural de Compuestos Fenólicos en la Matriz Alimentaria

De acuerdo con Parada & Aguilera. (2007), la manera en que las microestructuras interaccionan con el resto de los componentes de la matriz alimentaria afecta los procesos de accesibilidad, bioaccesibilidad y biodisponibilidad del componente. En su revisión los autores mencionan que estas microestructuras pueden encontrarse en su forma libre, unidas a estructuras más complejas, unidas a organelos específicos como por ejemplo a las membranas celulares, confinadas dentro de las paredes celulares intactas de las plantas o atrapadas en las matrices alimentarias (Figura 3).

Por otra parte, se ha destacado que dependiendo de la complejidad de la interacción del componente bioactivo y/o nutriente es la dificultad que se presenta para que estos sean absorbidos. De tal manera que en el caso particular de los compuestos fenólicos presentes en cereales la predominancia de interacciones de tipo covalente con otras estructuras de la matriz alimentaria puede dificultar que estos ejerzan su actividad biológica a través de procesos de digestión y absorción.

En la ciencia de los cereales, los polisacáridos no amiláceos (PNA) es un término genérico para los arabinoxilanos (AX), β -glucano, celulosa y péptidos-arabinogalactanos, es decir, polisacáridos que difieren de amilosa y amilopectina.

Aproximadamente, el 75% del peso de la materia seca en las paredes celulares del endospermo de trigo se compone de PNA de los cuales los arabinoxilanos son el grupo más importante (85%), existen dos tipos de arabinoxilanos, los extraíbles en agua que pueden encontrarse en mayor proporción en el endospermo del grano y los de tipo insolubles en agua que regularmente se encuentran en las capas más externa de los granos (pericarpio) (Goesaert et al., 2005; Morales-Ortega et al., 2013).

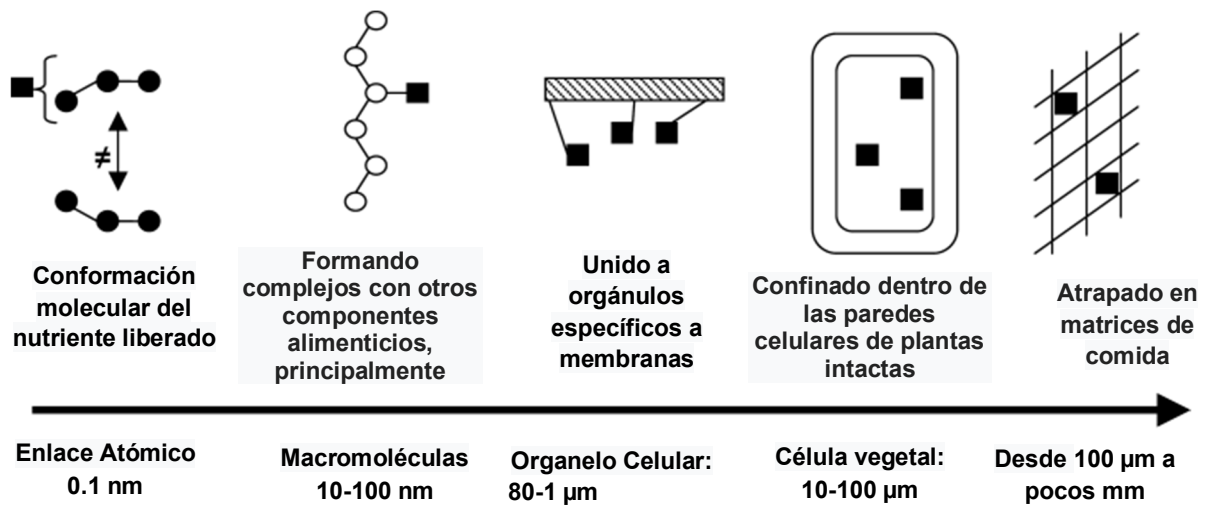


Figura 3. Disposición estructural de compuestos fenólicos en la matriz alimentaria.

Fuente: Parada & Aguilera (2007)

Se ha sugerido que el ácido ferúlico presente en cereales se encuentra predominantemente unido a los componentes estructurales de la pared celular como la celulosa, la hemicelulosa (por ejemplo, arabinoxilanos), la lignina, la pectina y las proteínas estructurales (Morales-Ortega et al., 2013; Salazar-López, González-Aguilar, Rouzaud-Sández, & Robles-Sánchez, 2018; Wong, 2006). En la Figura 4, se representan las posibles interacciones que se dan entre las diversas estructuras que componen la pared celular. Al estar dispuesto de esta manera, el ácido ferúlico desempeña funciones importantes en la pared celular al proporcionar barreras físicas y químicas, protección contra la invasión de patógenos y astringencia que disuade el ataque de insectos y animales, funciones antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes (Liu, 2007; Sancho, Williamson, Faulds, Bartolomé, & Gómez-Cordovés, 2001).

En estudios en trigo y sorgo se ha demostrado que hasta un 99% del contenido de ácido ferúlico se encuentra unido a arabinoxilanos presentes en el pericarpio (salvado) (Hemery et al. 2011; Mateo Anson et al. 2009; Salazar-López et al. 2016).

Los arabinoxilanos son cadenas de xilosas unidas por enlaces α -(1-4) y sustituidas por monómeros de arabinosas en enlaces α -(1 \rightarrow 3) o α -(1 \rightarrow 2). El ácido ferúlico se encuentra unido por enlaces éster en la posición 0-5 a las arabinosas. La Figura 5 muestra este arreglo en donde puede presentarse la posibilidad de que el ácido ferúlico forme dímeros, trímeros incluso puede formar puentes ferulados para unirse a otra cadena de arabinoxilanos.

Bioaccesibilidad de Compuestos Fenólicos

Algunas variedades de sorgo (*Sorghum bicolor*), que son cultivos alimentarios básicos resistentes a la sequía de regiones semiáridas de África y Asia, contienen altas cantidades de compuestos fenólicos en comparación con otros cereales (Linda Dykes, 2019; Suhendro, Kunez, McDonough, Rooney, & Waniska, 2000).

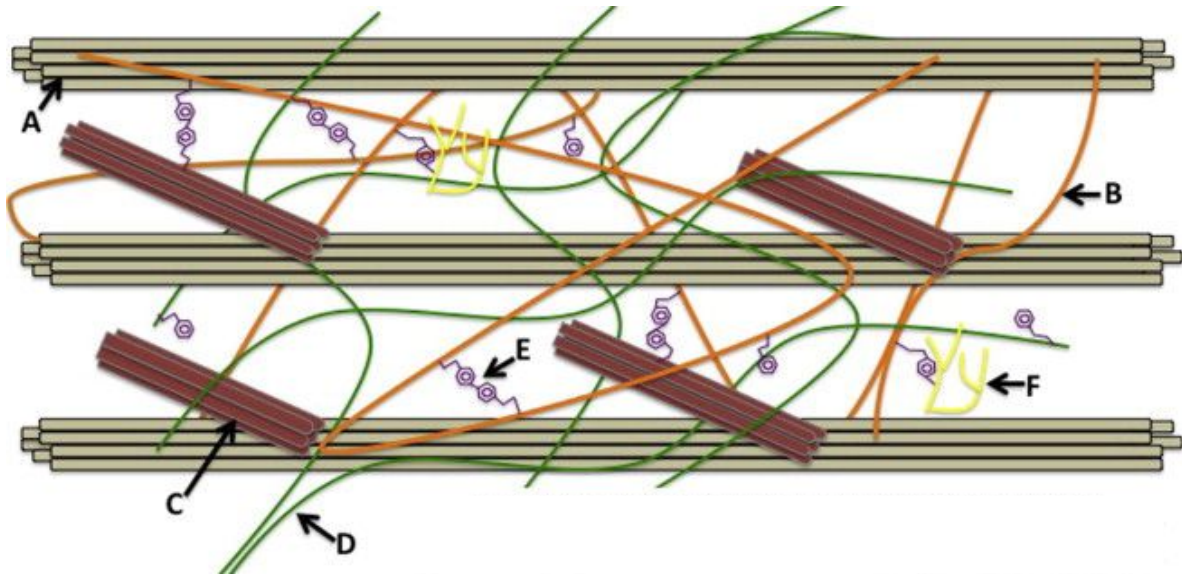


Figura 4. Representaciones de la estructura primaria de la pared celular del material vegetal y la reticulación entre componentes estructurales y compuestos fenólicos. (A) Celulosa; (B) Hemicelulosa; (C) Proteínas estructurales; (D) Pectina; (E) Ácidos fenólicos; (F) Lignina.

Fuente:(Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe, & Serna-Saldívar, 2014).

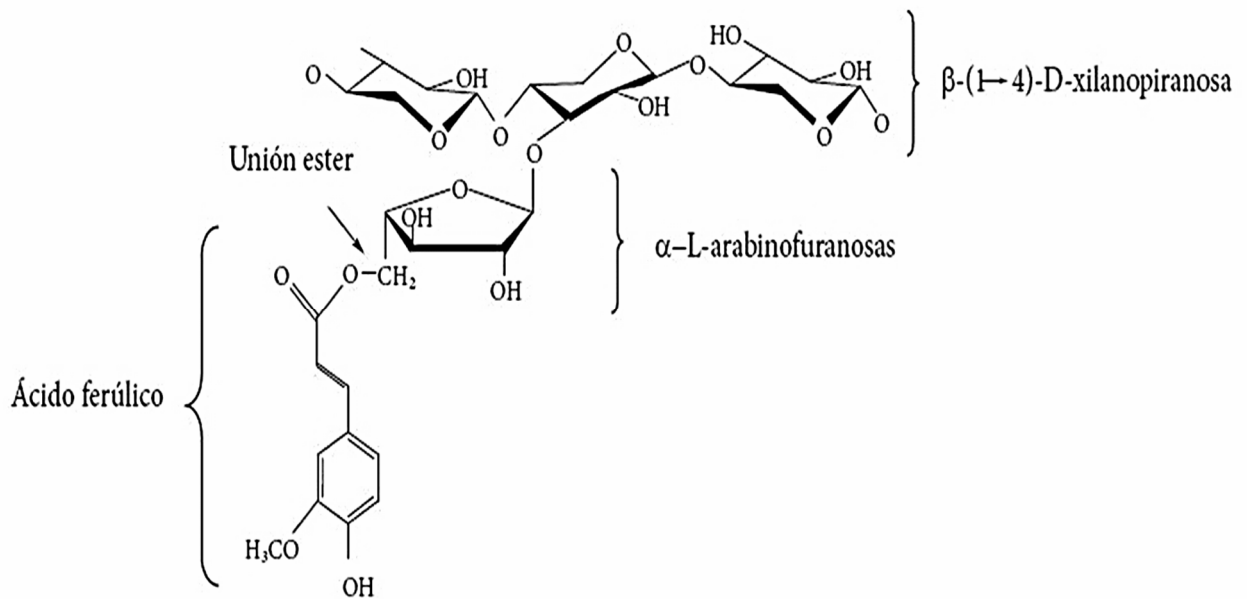


Figura 5. Estructura química de una fracción representativa de un arabinoxilano ferulado.

Fuente: (Morales-Ortega et al., 2013).

.Muchos estudios epidemiológicos han correlacionado el consumo de cereales integrales con un riesgo reducido de desarrollar cáncer de colon y de seno, diabetes tipo 2 y enfermedad coronaria (De Munter, Hu, Spiegelman, Franz, & Van Dam, 2007; Fardet, 2010; Zhu, Shi, Yao, Hao, & Ren, 2017)

Para ejercer sus efectos beneficiosos para la salud, los polifenoles de estos cereales deben de estar biodisponibles. La biodisponibilidad depende de la liberación de estos compuestos de la matriz alimentaria, y a esto se le conoce como bioaccesibilidad. Se sugiere que el tracto gastrointestinal puede actuar como un extractor donde los polifenoles se liberan progresivamente de la matriz sólida y se ponen a disposición para la absorción o para ejercer sus efectos biológicos en el tracto gastrointestinal (Hithamani & Srinivasan, 2014). Pekkinen et al. (2014), proponen un modelo de bioaccesibilidad para ácido ferúlico, en el cual suponen que el ácido ferúlico libre que llega a intestino delgado puede ser absorbido y ejercer su actividad biológica a nivel sistémico, mientras que el ácido ferúlico ligado a arabinosilanos puede no ser liberado y pasar a colon en donde es posible que el ácido ferúlico sea metabolizado por la microbiota intestinal (Figura 6).

La mayoría de los estudios de bioaccesibilidad de ácido ferúlico han sido realizados en salvado de trigo y mediante ensayos de simulación de la digestión *in vitro*, se ha observado que la bioaccesibilidad puede alcanzar hasta un 1%, estos resultados han sido mejorados hasta en 5% cuando la matriz alimentaria ha sido modificada por la aplicación de algún tipo de procedimiento tecnológico previo a la digestión, con el fin de liberar una mayor cantidad del compuesto que se encuentra de manera ligada o conjugada.

Estos procedimientos tecnológicos aplicados en trigo han incluido molienda fraccionada, molienda ultrafina, uso de enzimas y fermentaciones tanto de las masas de trigo como del salvado derivado de la molienda (Hemery et al., 2011; Mateo Anson et al. 2009; Amaya- Villalva et al. 2018).

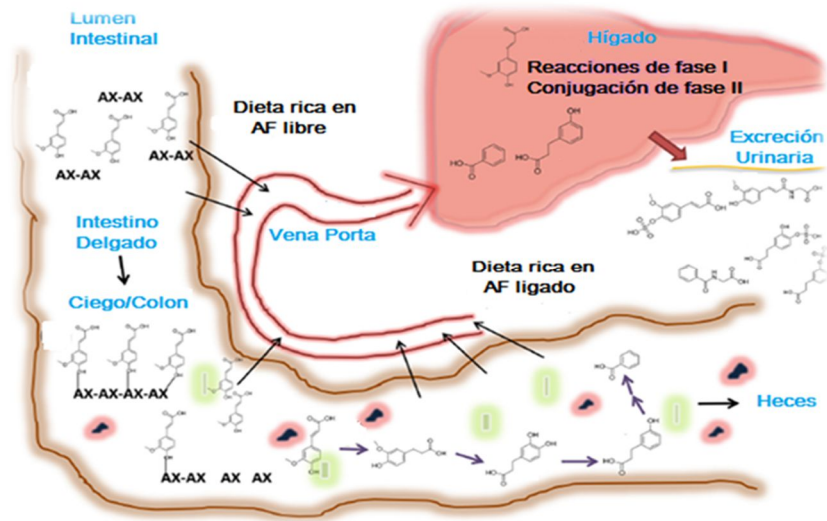


Figura 6. Modelo representativo del proceso de bioaccesibilidad de ácido ferúlico bajo condiciones de digestión gastrointestinal.

Fuente: Pekkinen et al. (2014).

Métodos Tecnológicos Aplicados en Sorgo para Mejorar el Contenido de Ácido Ferúlico

Como todos los cereales el sorgo debe de ser procesado antes de su consumo. No existe una limitante que impida que el sorgo pueda ser sometido desde procesos elementales como la molienda del grano para reducción del tamaño de partícula y decorticación para separación del pericarpio del endospermo, hasta procesos tradicionales como remojo, cocción y nixtamalización, entre otros.

En los últimos años las tecnologías emergentes tales como campos eléctricos pulsados, altas presiones hidrostáticas, radiación, calentamiento óhmico, extrusión, bioprocesamiento (germinación, fermentación y uso de enzimas) entre otras, están siendo prometedoras para ser utilizadas en cereales para la obtención de productos con alta calidad nutricional y sensorial. Pero además también se han venido estudiando estos procesos para el mejoramiento de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de compuestos fenólicos.

Las tecnologías aplicadas en sorgo pueden catalogarse dentro del grupo de tecnologías tradicionales, particularmente porque son de bajo costo y requieren de poco tiempo para llevarlas a cabo. La mayoría de los estudios sobre procesamiento del sorgo han sido con la finalidad de mejorar la digestibilidad de su proteína, y también se han realizado estudios enfocados hacia la obtención de productos de consumo tradicional como galletas, tortillas, porridges, bebidas fermentadas entre otros.

Los estudios sobre mejoramiento del potencial biológico en sorgo han sido muy limitados y enfocados en su gran mayoría a evaluar el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante. Se ha observado que la reducción en el tamaño de la partícula (molienda) altera la estructura física de los granos, aumentando su área superficial, lo que potencialmente aumenta la accesibilidad de sus constituyentes químicos (Akillioglu & Karakaya, 2010; Jha, Krishnan, & Meera, 2015).

Los procesos de remojo y cocción del grano de sorgo han mostrado ser efectivos en relación al aumento de compuestos fenólicos siempre y cuando el agua de remojo no se haya descartado (Afify, El-beltagi, El-salam, & Omran, 2012; L. Wu et al., 2013).

El uso de microondas se ha venido estudiando como una manera de mejorar el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, aunque en sorgo no se han reportado estudios utilizando este proceso, se tiene conocimiento de que el uso de microondas puede modificar las estructuras de los arabinoxilanos causando la liberación de aproximadamente 50% del contenido de arabinoxilanos como oligómeros ferulados (Rose & Inglett, 2010).

La extrusión es un proceso termo-mecánico que ha sido muy estudiado por su efecto sobre algunos componentes de la matriz alimenticia. Durante la cocción por extrusión, las materias primas se someten a muchas transformaciones químicas y estructurales, tales como la gelatinización del almidón, la desnaturalización de proteínas, formación de complejos entre la amilosa y los lípidos, y las reacciones de degradación de las vitaminas, pigmentos, etc. (Ilo & Berghofer, 1999). Un estudio reciente realizado por Salazar-López et al. (2018), demostró que el proceso de extrusión en salvado de sorgo puede mejorar el porcentaje de bioaccesibilidad del ácido ferúlico desde un 0.61% para salvado sin procesar hasta un 0.96% para salvado extrudido.

En otro estudio realizado por Ti, Zhang, Li, Wei, & Zhang (2015), reportaron un incremento de 12.6% en el contenido fenólico total de salvado de arroz después de la extrusión. Esto es consistente con los resultados de Zielinski et al. (2001), los cuales obtuvieron en su estudio un aumento del contenido de fenoles totales y ácidos hidroxicinámicos (principalmente ácidos ferúlico y *p*-coumárico) en cebada, arroz, avena, trigo y sorgo después de la extrusión a temperaturas de 120, 160 y 200 ° C, con un 20% de humedad. Lo anterior sugiere que el tratamiento térmico de los cereales puede causar la liberación de ácidos fenólicos de las paredes celulares potenciado por las otras condiciones de proceso de extrusión (velocidad de tornillo, temperatura y humedad).

Los tratamientos biológicos (bioprocésamiento) han sido ampliamente estudiados en cereales, especialmente los tratamientos con enzimas, germinación y fermentación. El uso de la enzima ferúlico esterasa ha sido ampliamente estudiado en cereales como el trigo (Elvaux, 2004; Mateo Anson et al., 2009). Esta enzima es específica para romper el enlace éster entre arabinosa y ácido ferúlico.

Diversos estudios han demostrado que una eficiente liberación del ácido ferúlico unido a la arabinosa por acción de ferúlico esterasa, puede presentarse cuando previamente han actuado otras enzimas como arabinofuranosidasas, endo y exo xilanasas, las cuales permitirán que ferúlico esterasa llegue a su sitio de rompimiento con mayor facilidad. El uso de enzimas pudiera ser un tratamiento muy efectivo en la liberación de ácido ferúlico y por tanto un aumento en la bioaccesibilidad, no obstante, este procedimiento pudiera resultar bastante costoso cuando es sugerido a escala industrial (Andreasen, Christensen, Meyer, & Hansen, 1999; Anson et al., 2009; Linda Dykes, 2019; Ripari, Bai, & Gänzle, 2019).

La germinación ha sido usualmente utilizada para la producción de bebidas a partir de cereales. Varios estudios han mostrado que el proceso de germinación puede incrementar el contenido de compuestos fenólicos extraíbles en granos de cereales (Bondia et al., 2009; Katina, Laitila, et al., 2007; Kaukovirta-norja, Wilhelmson, & Poutanen, 2004). Por ejemplo en granos de centeno germinado a 5, 10 y 25 °C por 6 días se presentó un incremento en el contenido de compuestos fenólicos extraíbles en metanol (Liukkonen., 2003) siendo la germinación a 25°C la que resultó con el mayor incremento.

Se ha sugerido que la germinación induce la síntesis/activación de un rango de enzimas hidrolíticas en el grano germinado, resultando en la modificación estructural o síntesis de nuevos compuestos con alta actividad biológica o nutricional. No obstante, aún se requiere de mayores estudios relacionados con las condiciones de proceso de germinación con el fin de obtener el máximo valor biológico y nutricional de los granos germinados.

La fermentación es un proceso que contribuye de muchas maneras a las cualidades nutricionales de los productos de panadería resultantes, incluida una disminución de la respuesta glucémica, propiedades mejoradas del complejo de fibra dietética y una mayor biodisponibilidad de micronutrientes y fitoquímicos (Gobbetti, Rizzello, Cagno, & Angelis, 2013; Isabel-Bondia et al., 2009).

Los fines principales de la fermentación son el mejoramiento del sabor y estabilidad de las masas, no obstante, con el desarrollo de la industria de la panificación, se ha venido perfeccionando más el proceso de fermentación con el desarrollo de cultivos microbianos específicos y el control en las variables del proceso de la fermentación, lo que ha impactado en la textura de los productos y al mismo tiempo en lo relacionado con efectos nutricionales (Chiremba et al., 2009; Katina, Arendt, Liukkonen, & Autio, 2005).

Procesos Fermentativos en Cereales y su Influencia sobre Compuestos Fenólicos

La fermentación, puede definirse como la modificación bioquímica de productos primarios presentes en los alimentos llevada a cabo por la acción de microorganismos y sus enzimas. La fermentación es intencionalmente llevada a cabo para favorecer el sabor, aroma, vida media, textura, valor nutricional y otras propiedades de los alimentos (Adebo, 2020; Chhikara et al. 2019; Jafari et al. 2018).

Se trata de un proceso ampliamente utilizado en muchas partes del mundo, con diferencias regionales dependiendo de la disponibilidad de la materia prima, hábitos de consumo, la naturaleza de los procesos y una variedad de factores involucrados.

La fermentación es uno de los procesos biotecnológicos más antiguos, en donde el vino y la cerveza podían ser producidos ya sea por levaduras o por bacterias ácido-lácticas. La fermentación espontánea fue usada en los tiempos antiguos mediante la activación de los microorganismos presentes de manera natural en los granos molidos. En tiempos recientes se ha venido sistematizando el uso de masas madres, desarrollando cultivos microbianos y mantenidos para posteriores fermentaciones.

Durante la fermentación de los cereales, típicamente hasta 24 horas a temperaturas moderadas, la actividad metabólica de los microorganismos presentes está en interacción con los constituyentes del grano, las bacterias ácido-lácticas (BAL) producen ácido láctico y acético, reduciendo el pH regularmente por debajo de 5 y cuando se hace uso de levaduras, estas producen dióxido de carbono y etanol (Poutanen et al. 2009).

Las variaciones en las condiciones de la fermentación contribuyen a la activación de las enzimas presentes y los ajustes de pH selectivamente favorecen el desempeño de ciertas enzimas tales como amilasas, proteasas, hemicelulasas y fitasas (Hole et al. 2012; Katina, Liukkonen, et al. 2007).

Las enzimas inducen cambios junto con los metabolitos microbianos llevando a cambios en las propiedades funcionales y nutricionales de los cereales fermentados. Así pues, la fermentación de las masas puede influenciar la calidad nutricional ya sea reduciendo o incrementando los niveles de los componentes y favoreciendo o retardando la biodisponibilidad de nutrientes (Faulds & Williamson, 1995; Sancho et al., 2001).

Muchos de los cambios observados en la degradación y solubilización de la fibra dietaria, pueden ser explicados por la contribución de enzimas endógenas, especialmente xilanasas provenientes del mismo grano de cereal o de microorganismos añadidos (Boskov Hansen et al., 2002; Ornez, Ebruers, Iame, Elcour, & Ourtin, 2006).

Tomados en conjunto, el metabolismo microbiano puede influir de manera significativa en el contenido de nutrientes como las vitaminas y minerales, así como también en el contenido de compuestos bioactivos. Estudios llevados a cabo en masas madre de centeno han demostrado que la actividad antioxidante medida como DPPH se incrementa asociado este efecto a un incremento en el contenido de fenoles (extraídos con metanol) (Kirsi-Helena Liukkonen, Kati Katina, Annika Wilhelmsson, Olavi Myllymaki, 2003). Estudios más recientes en salvado de trigo demostraron que la

acción combinada de fermentación con levadura y enzimas hidrolíticas de la pared celular mejorar la bioaccesibilidad *in vitro* en panes (Anson et al. 2011).

Poutanen, Flander, & Katina. (2009), esquematizan un posible mecanismo de los efectos del proceso de fermentación los cuales pueden influir sobre la calidad nutricional y compuestos bioactivos en masas panarias (Figura 7).

Además, de la síntesis o transformación enzimática de varios compuestos bioactivos que puede ocurrir durante los procesos de fermentación, los efectos de la fermentación sobre los compuestos fenólicos dependen principalmente de los tipos de granos, especies de microorganismos y las condiciones de fermentación, en particular la temperatura, el pH y el tiempo (Boskov Hansen et al. 2002; Dordević et al. 2010; Kariluoto et al. 2006; Katina, Liukkonen, et al. 2007)

Fermentación Ácido-Láctica

Las bacterias productoras de ácido láctico (BAL) son un grupo de bacterias que utilizan como sustrato a los carbohidratos para producir ácido láctico como producto metabólico principal (Abdel-Rahman, Tashiro, & Sonomoto, 2013). Las BAL pueden seguir dos tipos de procesos fermentativos: homofermentativo y heterofermentativo. El primer tipo de fermentación produce más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa. Las bacterias predominantes que participan en este proceso son las del género *Lactobacillus* (Hole et al., 2012; Ni, Wang, Cai, & Pang, 2015), este tipo de fermentación es el más recomendado en la industria alimentaria, particularmente porque es donde se obtiene el mayor contenido de ácido láctico en términos de rendimiento y también porque los productos derivados de esta fermentación homofermentativa pueden potenciar las características sensoriales de los productos derivados (Koistinen et al. 2018).

El segundo tipo de fermentación láctica, la heterofermentativa, produce solo 50% de ácido láctico. Las bacterias participantes pueden ser del género *Lactobacillus*, pero además también pueden intervenir otras de la familia de bacterias ácido-lácticas,

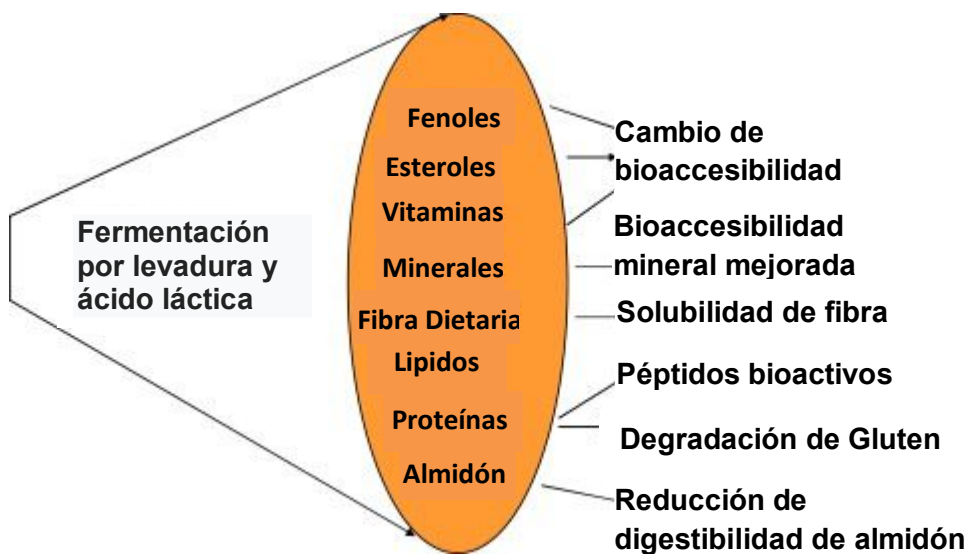


Figura 7. Posibles mecanismos por los cuales la fermentación de masa fermentada puede influir en la calidad nutricional.

Fuente: (Poutanen et al., 2009)

Leuconostoc pseudomesenteroides, *Leuconostoc citreum*, *Weissella cibaria*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*. Esto da como resultado que además de ácido láctico, se obtengan otros productos finales como metanol, ácido acético, ácido málico (Ni et al. 2015). Finalmente, el producto final derivado de este tipo de fermentación no suele ser sensorialmente atractivo. Las bacterias ácido-lácticas se usan en la industria alimentaria por varias razones, una de las principales es que su cultivo disminuye el pH debido a la producción de ácido láctico. Es este proceso de acidificación uno de los efectos más deseables del uso de BAL llegando a bajar el pH hasta 4.0, lo suficientemente bajo como para inhibir el crecimiento de otros microorganismos, incluidos los patógenos humanos más comunes, lo que permite que estos alimentos prolonguen la vida útil (Wee, Kim, & Ryu, 2006). Las BAL pertenecen a grupos bacterianos de la familia de Firmicutes compuesto por aproximadamente 20 géneros entre los cuales se encuentran *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus* y respecto a *Lactobacillus* es el más grande de estos géneros y comprende alrededor de 80 especies reconocidas (Holzapfel, Haberer, Geisen, Björkroth, & Schillinger, 2001; Jay, 2000; Wessels et al. 2004).

Desde el punto de vista tecnológico, la fermentación ácido-láctica se puede presentar de manera espontánea y mediante el uso de inóculos, este último procedimiento presenta la posibilidad de mantener un control sobre el tipo de bacterias fermentativas y de las condiciones de fermentación (Holzapfel, 2005). Los inóculos iniciadores de fermentación pueden ser puros y son cultivados bajo condiciones controladas. El otro tipo de inoculación es por la técnica denominada *backslopping* y consiste en llevar a cabo fermentaciones sucesivas del mismo material que va a ser sometido a fermentación, una vez obtenido un fermento altamente concentrado en bacterias ácido-lácticas, este se incorpora a la masa o material a fermentar. La ventaja de este método es que no implica el aislamiento de las bacterias ácido-lácticas, es de bajo

costo y particularmente se reduce significativamente el tiempo de fermentación a diferencia de los otros procesos fermentativos mencionados anteriormente.

En cualquiera de las maneras en que se presente el proceso de fermentación, el isómero L(+) ácido láctico es preferido como producto final, dado que este puede tener un mayor uso en producción de alimentos, particularmente por la baja acidosis que presenta durante el proceso de digestión gastrointestinal (Holzapfel., 2005). Las BAL que producen >90% este isómero como producto final de la fermentación de azúcares incluyen los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Carnobacterium*.

La mayoría de estos géneros pueden utilizar glucosa y xilosa como sustratos para llevar a cabo el proceso de fermentación, no obstante, en este último, el rendimiento de obtención de lactato es más bajo en relación con glucosa. Lo anterior pudiera ser de importancia para la producción a gran escala de lactato. Sin embargo, si se toma en cuenta que la xilosa es el principal constituyente de hemicelulosas (arabinoxilanos) y lignocelulosa y el segundo azúcar más abundante en la naturaleza después de la glucosa (Abdel-Rahman et al., 2013) pudiera esta situación ser aprovechada para la obtención de oligómeros con actividad biológica y de compuestos fenólicos unidos por enlaces más débiles (fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno, etc.) o atrapados en organelos de la célula que pueden también ser liberados por la acción degradativa del proceso de fermentación.

Fermentación con Levadura

Las levaduras son organismos eucariotas con gran diversidad respecto a su tamaño, forma y color. Son consideradas hongos unicelulares y generalmente sus células son ovaladas, pero también pueden encontrarse en forma esférica, cilíndrica o elíptica. Son de mayor tamaño que las bacterias, alcanzando un diámetro máximo de entre cuatro y cinco μm (Aleman, 2016; Pérez et al. 2007). *Saccharomyces cerevisiae*, es de las levaduras con mayor uso en la industria alimentaria, es una levadura heterótrofa, que obtiene la energía a partir de la glucosa con la concomitante producción de CO_2 y alcohol (Querol, Fernández-Espinar, Del Olmo, & Barrio, 2003).

Las levaduras también pueden contribuir a la seguridad y calidad de los alimentos en función de sus posibles acciones sobre los hongos y los metabolitos indeseables producidos por estos últimos. Como tales, pueden ayudar a desintoxicar las micotoxinas degradándolas o uniéndolas a la pared celular de la levadura (Moslehi-Jenabian, Pedersen, & Jespersen, 2010).

De los procesos de fermentación del tipo no lácteos, los que más destacan son las fermentaciones en cereales, que son populares en las regiones tropicales y en el continente africano en particular. Al igual que con muchos productos a base de leche, el componente microbiano natural se utiliza para fermentar granos como el maíz, el mijo, la cebada, la avena, el centeno, el trigo, el arroz o el sorgo y regularmente los granos a menudo se calientan, trituran y algunas veces se filtran. El “backslop” es bastante común, pero las poblaciones microbianas responsables de la fermentación de estas bebidas no están muy bien caracterizadas.

En un estudio llevado a cabo por Rashad, Mahmoud, Abdou, & Nooman. (2011) determinaron la actividad antioxidante por el ensayo de DPPH de diversos extractos metanólicos de salvado de soya fermentada. Se encontró que todos los extractos, mostraron distintos porcentajes de secuestro del radical que fueron desde 62 a 83% en comparación al control (extracto de soya esterilizado no fermentado). El contenido fenólico total del extracto de metanol de soya fermentada, dependiendo del organismo iniciador, varió entre 0.74 y 4.50 mg EAG/g de soya seca, todos fueron más altos que los obtenidos en las muestras control.

Por otra parte Skrajda-Brdak, Konopka, Tańska, & Czaplicki. (2019) evaluaron el impacto de dos tipos de fermentación (ácido láctico y por levadura) sobre el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, utilizando harinas de diferentes fuentes de cereales (trigo y centeno), incluyendo sus respectivos panes. Los resultados a los que llegaron fue que el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante se incrementó notablemente en los panes con relación a las harinas, no obstante, entre tipos de fermentación los resultados fueron inconsistentes atribuyendo este efecto a la naturaleza de la fermentación, así como al proceso de horneado.

Anson et al. (2009) llevó a cabo estudios de bioprocesamiento del salvado de trigo por fermentación y por la acción combinada de enzimas hidrolíticas y fermentación con levadura, resultando en un incremento de ácidos fenólicos libres en los panes de trigo.

En otro estudio, Adebo, Njobeh, & Kayitesi, (2018) obtuvieron muestras de diferentes cultivares de sorgo después de la fermentación a 34 ° C durante 24 h 28 °C durante 72 h, utilizando dos tipos de levaduras y estos cultivos iniciadores individuales arrojaron mejores resultados en todos los análisis respecto al control, en el contenido de taninos (0.41–2.83 mg EC/g), contenido fenólico total (8.11–32.13 mgEAG/g) y contenido de flavonoides (7.53–26.38 mg EC/g), y actividad antioxidante (4.82–7.81 µMET/g) respecto al control.

Călinoiu, Cătoi, & Vodnar, (2019) estudió el efecto del tiempo de fermentación usando levadura en salvado de trigo y de avena, sobre el contenido de fenoles y actividad antioxidante, demostrando que en los días 2-4 se presentaron los valores más altos en estos componentes atribuyendo a que en este tiempo se presenta con mayor intensidad la actividad de la levadura promoviendo cambios en la pared celular. Los resultados de estos estudios sugieren que la fermentación de granos enteros puede ser un procedimiento útil para el incremento de antioxidantes en cereales.

Procesos Fermentativos en Masas de Sorgo para Mejorar su Potencial Biológico

Se ha reportado ampliamente el uso de *backslopping* para fermentación en masas de cereales (Kim, Jeong, Song, & Seo, 2018; Shrivastava & Ananthanarayan, 2014; Vrancken, Rimaux, Weckx, Leroy, & De Vuyst, 2011a), en sorgo los estudios son muy numerosos debido a que las masas fermentadas de sorgo forman parte básica de la dieta de poblaciones asiáticas y africanas (Gabaza et al. 2019; Olufunmilayo S. Omoba, Taylor, & de Kock, 2015; Sekwati-Monang & Gänzle, 2011). Los esfuerzos se han enfocado hacia cambios en las características sensoriales y estructurales de las masas, así como también en sus propiedades reológicas.

Específicamente en sorgo, los estudios sobre potencial biológico atribuido al proceso de fermentación son escasos, la mayoría de estos estudios han sido enfocados hacia la evaluación del efecto sobre compuestos fenólicos y actividad antioxidante (Mohapatra, Patel, Kar, Deshpande, & Tripathi, 2019; Sekwati-Monang, Valcheva, & Gänzle, 2012; Shumoy, Gabaza, Vandeveld, & Raes, 2017), dejando un campo por explorar el referente a la bioaccesibilidad y absorción *in vitro* e *in vivo* de estos compuestos.

El estudio llevado a cabo por Sekwati-Monang et al. (2012), aunque no estuvo relacionado con el potencial biológico de masas fermentadas de sorgo, fue muy relevante en el sentido de que caracterizó microbiológicamente inóculos iniciadores de fermentación de masas de sorgo. En este estudio se llevaron a cabo distintos procesos de fermentación en sorgo para la obtención de un producto de consumo tradicional africano llamado *Ting*, y demostraron que la técnica de “backslopping” puede reducir hasta 8 horas el tiempo de fermentación, en donde las cepas predominantes identificadas en el cultivo iniciador fueron: *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus harbinensis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus coryniformis* y además con una carga muy baja de bacterias del género *Enterobacteriaceae*. Al ser una fermentación en la que participaron varios microorganismos se trató de una fermentación heterofermentativa en donde el producto predominante fue ácido láctico, pero además también se obtuvieron cantidades importantes de acetato, etanol, 1,2 propanodiol y 1,3 propanodiol.

Svensson et al. (2010) fermentaron masas de sorgo rojo con diferentes cepas de Lactobacilos y demostraron que el perfil de fenoles disminuyó significativamente después del proceso de fermentación atribuyendo este efecto a la transformación de ácidos fenólicos y glucósidos de flavonoides por acción de enzimas producidas por los microorganismos utilizados para el proceso.

Dlamini et al. (2007) estudiaron el efecto de la fermentación de masas de sorgo con y sin taninos y reportaron que en sorgo con taninos el contenido de fenoles y actividad

antioxidante se incrementó significativamente en relación al sorgo sin taninos. Cuando estas masas fueron cocinadas para preparar un alimento tipo porridges o atole, reportaron una disminución en el contenido total de fenoles y la capacidad antioxidante. Aparentemente, la variedad de sorgo, el tiempo de fermentación, y posiblemente el inóculo empleado influyeron directamente en el contenido de compuestos fenólicos en los productos.

Un comportamiento diferente es el que se presentó en el estudio reportado por Zaroug, Orhan, Senol, & Yagi. (2014) quienes estudiaron el efecto del proceso fermentación en masas de dos cultivares de sorgo (*Tabat* y *Wad Ahmed*) sobre el contenido de fenoles totales y demostraron que en cultivar *Tabat* el contenido disminuyó significativamente a 32 horas de fermentación, mientras que *Wad Ahmed* no mostró cambios importantes a lo largo del proceso fermentativo en estos compuestos. En este mismo estudio se evaluó el efecto de cocción de estas masas fermentadas para la obtención de un alimento tradicional llamado *kisra* y demostraron que el proceso de cocción mejoró significativamente el contenido de fenoles totales independientemente del cultivar de sorgo procesado.

Nomusa Rhoda (2007) demostró que el proceso de fermentación afectó de manera distinta dependiendo del cultivar de sorgo utilizado, de tal manera que sorgo sin testa pigmentada posee menor contenido de fenoles totales en relación con sorgo pigmentado. En este mismo estudio se probaron dos cultivares de sorgo (*Macia* y *Framida*) y cuando estos granos fueron decorticados el cultivar de sorgo *Macia* conservó su contenido de fenoles totales. El proceso de fermentación de estos dos cultivares demostró que el cultivar *Macia* retuvo su contenido de fenoles totales. Mientras que sorgo cv. *Framida* no logró recuperar el contenido original. De las masas fermentadas, se obtuvieron porridges y el contenido de fenoles se vio mejorado en el cultivar *Macia* mientras que en los porridges de sorgo *Framida* los compuestos fenólicos no fueron detectados.

Taylor & Duodu. (2015) destacan en su trabajo de revisión que el contenido de fenoles puede significativamente ser reducido en muestras de sorgo sometidas a fermentación

láctica y atribuyen este efecto principalmente a la activación de enzimas como la polifenol oxidasa, peroxidasa entre otras, presentes de manera natural en las masas de sorgo, así como también explican que el medio ácido generado por la acción de las bacterias lácticas puede abstraer iones hidrógeno y provocar rearrreglos en las estructuras de los ácidos fenólicos, asimismo mencionan la posibilidad de que los compuestos fenólicos interaccionen con estructuras proteicas que impiden su solubilización en el sistema de extracción.

Olufunmilayo Sade Omoba & Isah (2018) llevaron a cabo un estudio de masa de sorgo fermentada por el proceso de *backslopping* para la obtención de bísquets, y encontraron que los valores de fenoles totales y actividad antioxidante (medida como ABTS) se incrementaron en un 17 y 30% respectivamente, en bísquets que fueron preparados con masas fermentadas.

Mohapatra, Patel, Kar, Deshpande, & Tripathi (2019), evaluó el efecto de fermentación en sorgo y observaron una reducción del 28% de fenoles totales pero un incremento importante en la actividad antioxidante (1.4 - 6 veces) mientras que en sorgo fermentado combinado con cocimiento con vapor y hojuelado la actividad antioxidante se incrementó 2.9 veces.

La mayoría de los estudios anteriormente descritos, reportan resultados muy variables en cuanto al contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, los efectos se presentan positivos (incremento) o negativos (reducciones) dependiendo del tipo de fermentación, microorganismos fermentadores, tipo y tiempo de fermentación e incluso la mayoría de los estudios coinciden que cuando las masas fermentadas de sorgo son sometidas a algún tipo de procesamiento térmico, el potencial biológico se incrementa.

En cuanto a fermentación usando levadura, realmente son escasos los estudios en sorgo, en los que haya sido evaluado el efecto de este proceso sobre el contenido de fenoles y actividad antioxidante. Los estudios existentes particularmente se enfocan hacia fermentación de sorgo para la obtención de cerveza u otras bebidas (Djameh et al. 2019; Konfo et al. 2015), y también se han reportado estudios en donde se ha

evaluado el efecto de la fermentación con levadura sobre rendimiento de etanol (Kanakaraju et al. 2020; Zhang et al. 2019).

Puede mencionarse un estudio llevado a cabo por Valenzuela Gutiérrez (2018), quien evaluó el efecto de la adición de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) a masas de sorgo, y demostró que después de 4 y 8 horas de fermentación el contenido de fenoles y de actividad antioxidante se incrementó 3 y 4 veces más respecto a la masa sin fermentar. Este estudio condujo a motivar mayor investigación en el uso de levadura para fermentación de masas de sorgo, similar al proceso de panificación en masas de trigo para la producción de productos horneados como galletas con potencial biológico y calidad sensorial aceptable.

Antioxidantes como Agentes Terapéuticos contra el Estrés Oxidativo

Los tratamientos efectivos para reducir enfermedades crónico-degenerativas en humanos incluyen en primera instancia, modificaciones en el estilo de vida, tales como restricción calórica y ejercicio para promover pérdida de peso. Por otra parte, las dietas altas en antioxidantes pueden reducir el estrés oxidativo y respuestas inflamatorias con relativa asociación de la pérdida de peso (Liyana-Pathirana & Shahidi, 2006).

Se ha demostrado que el consumo de frutas y vegetales incrementa la actividad antioxidante *in vivo* en diferentes poblaciones. Los granos enteros ricos en fibra dietética, compuestos fenólicos y otros fitoquímicos también reducen el estrés oxidativo en individuos con síndrome metabólico (Slavin, 2003).

Belobrajdic et al. (2010) llevaron a cabo estudios en modelos murinos con inducción de inflamación y estrés oxidativo y demostraron que una dieta basada en cereales con alta y baja capacidad antioxidante puede mejorar los índices de inflamación y estrés oxidativo. Estudios similares utilizando extractos de salvado de arroz, demostraron una recuperación parcial de los niveles de adiponectina y reducción de valores proinflamatorios (Justo et al. 2016). Salazar-Lopez et al. (2017) evaluó el efecto del consumo de ácido ferúlico en ratas alimentadas con dietas altas en grasa demostrando

que después de 60 días de administración de la dieta, se presentaron cambios positivos en algunos biomarcadores de inflamación. Hsu & Yen (2008) realizaron una extensa revisión en relación con el efecto antiobesogénico atribuido a los compuestos fenólicos, demostrando que estos pueden impactar significativamente en la reducción de peso a través de mecanismos asociados a la inhibición o apoptosis de preadipocitos los cuales han sido estudiados como inductores de inflamación y crecimiento de tejido adiposo.

Muchos de estos fitoquímicos poseen la capacidad de interferir en las funciones celulares, la alteración de la activación de factores de transcripción que regulan la expresión de genes, y cambiar el metabolismo celular de diferentes maneras (Traka & Mithen, 2011; Tsao, 2010). Existen diversos estudios que demuestran que el consumo de antioxidantes dietarios pudiera tener un efecto benéfico en la prevención de estrés oxidativo causado por procesos inflamatorios de bajo grado asociados a obesidad. Tal como la explica Skawa et al. (2017), la obesidad es una condición que subyace a la aparición de enfermedades como diabetes, hipertensión, enfermedad cardiovascular y que son conocidas en su conjunto como síndrome metabólico (Figura 8).

Tal como lo mencionan Shiferaw Terefe & Augustin (2019), los alimentos fermentados están experimentando un resurgimiento debido al creciente interés de los consumidores por alimentos naturales y promotores de la salud. La fermentación microbiana es un proceso tecnológico el cual transforma materias primas hacia productos alimenticios palatables, nutritivos y saludables. La fermentación imparte aromas únicos, sabor y textura a los alimentos, mejora la digestibilidad de la proteína, degrada factores antinutricionales, toxinas y alergénicos, convierte fitoquímicos como los fenoles hacia formas bioactivas y biodisponibles y enriquece la calidad nutricional del alimento. La fermentación también modifica las propiedades funcionales físicas de los materiales alimenticios dando lugar a ingredientes para su uso en formulación de alimentos. Por último, el proceso de fermentación usando el método de “backslopping” puede ser una estrategia para la obtención de alimentos de bajo costo para mitigar la desnutrición y obesidad en países en desarrollo.

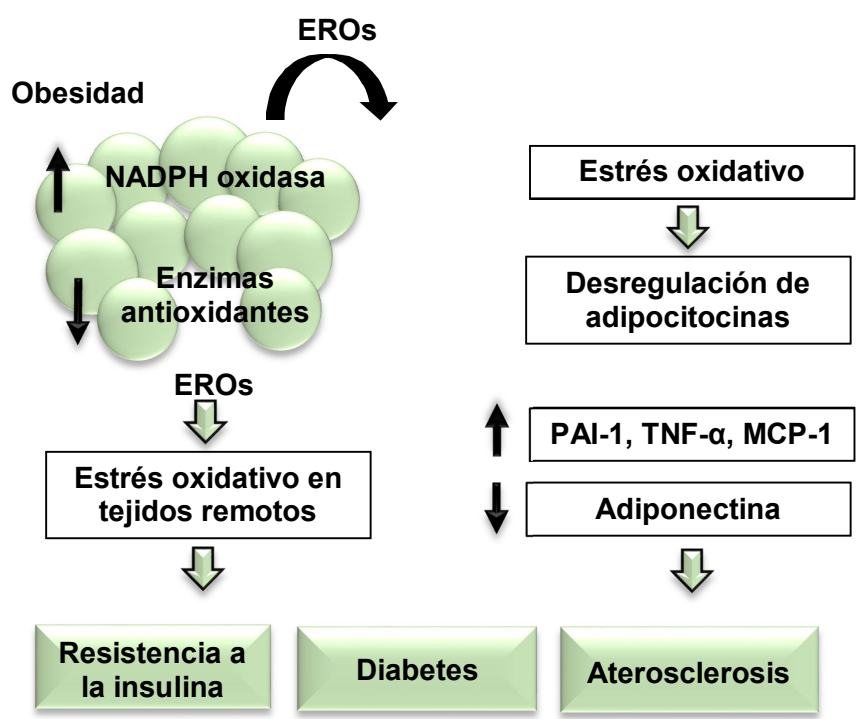


Figura 8. Modelo de producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) en grasa acumulada en tejido adiposo asociado al síndrome metabólico.

Fuente: Furukawa et al. 2017

HIPÓTESIS

Galletas formuladas a partir de masa de sorgo sometida a dos procesos fermentativos presentan mayor bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, ácido ferúlico y actividad antioxidante, manteniendo características sensoriales aceptables.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, ácido ferúlico y actividad antioxidante presentes en galletas formuladas a partir de masas de sorgo sometidas a dos procesos fermentativos y el impacto sobre sus características sensoriales.

Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto del tiempo de fermentación ácido-láctica y alcohólica en masas de sorgo sobre el contenido de compuestos fenólicos, ácido ferúlico y actividad antioxidante.
2. Evaluar la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y ácido ferúlico presente en galletas formuladas a partir de masas de sorgo sometida a dos procesos fermentativos.
3. Evaluar los atributos sensoriales de las galletas formuladas a partir de masas de sorgo sometida a dos procesos fermentativos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y Preparación de la Muestra

Se utilizó sorgo blanco de la variedad UDG-110 adquirido a través de la Fundación Produce Nayarit A.C. Tepic, Nayarit, México.

El grano de sorgo fue sometido a proceso de limpieza para la eliminación de granos dañados y de cualquier otro material extraño. Posteriormente fue sometido a molienda en un molino de discos Modelo Pulvex 200 hasta obtener un tamaño de partícula < 0.5 mm. La harina integral fue almacenada a -20°C.

Procesos de Fermentación

El diseño experimental para esta parte del estudio fue completamente al azar, en donde las variables independientes fueron dos tipos de fermentación (fermentación ácido-láctica por el método de *backslopping* y fermentación alcohólica por adición de levadura), aplicadas en masas de sorgo (unidad experimental) y las variables dependientes fueron el contenido de fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante. Se realizaron dos repeticiones de cada experimento y de cada repetición se obtuvieron duplicados para cada tiempo de fermentación evaluado.

Fermentación Ácido-Láctica

El proceso de fermentación se llevó a cabo siguiendo los procedimientos descritos por (Elkhalifa, Schiffler, & Bernhardt, 2005; Mallasy et al., 2010 y Shrivastava & Ananthanarayan, 2014), con algunas modificaciones.

El proceso consistió primeramente en preparar un inóculo iniciador de la fermentación, mediante la técnica de *backslopping*. Se preparó una masa de sorgo, para lo cual se tomaron 300 g de harina integral y se le añadieron 320 mL de agua. La masa obtenida se fermentó a 26°C y 70-80% HR, hasta alcanzar un pH aproximadamente de 4.0. Una vez alcanzado este valor de pH, se tomaron 30 g (≈5% de la masa total) y se añadieron

a un nuevo lote de masa fresca de sorgo y se permitió fermentar bajo las mismas condiciones hasta alcanzar un pH de 3.5. Alcanzado este pH, se consideró obtenido el inóculo iniciador.

Se prepararon dos lotes de masa de sorgo de acuerdo a las condiciones mencionadas anteriormente. A estas masas les fueron añadidos 30 g de inóculo iniciador, se mezcló durante tres minutos hasta obtener masas homogéneas las cuales fueron colocadas en charolas de 20 X 30 cm y puestas en una cabina fermentadora (National Meg. Co. Modelo 505-SS 2/3) a 26°C y 70-80% HR.

Se tomaron dos muestras de 10 g a diferentes intervalos de tiempo (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 y 48 horas). Una porción de estas muestras fue llevada a medición de pH y el resto sometido a congelación a -20°C. Estas muestras fueron etiquetadas como FLB (Fermentación láctica por “backslopping”).

Un procedimiento fermentativo similar se llevó a cabo de manera paralela sin inóculo iniciador. A esta fermentación se le etiquetó como FLN (Fermentación láctica natural).

Fermentación con Levadura

El procedimiento utilizado para la fermentación con levadura fue el sugerido por Amaya-Villalva et al. (2018) el cual corresponde al método convencional de fermentación de masas de trigo para la obtención de pan. Se formaron dos lotes de 300 g de harina integral de sorgo se le añadieron 320 ml de agua, en la cual previamente fueron disueltos 3 g de levadura panaria *Saccharomyces cerevisiae* (Nevada^{MR}) se mezcló durante tres minutos hasta obtener masas homogéneas las cuales fueron colocadas en charolas de 20 X 30 cm y puestas en un fermentador (National Meg. Co. Modelo 505-SS 2/3) a 36°C y 80% HR. Se tomaron dos muestras de 10 g a diferentes intervalos de tiempo (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 min) cada una de las muestras se congelaron a -20°C. Estas muestras fueron etiquetadas como FLEV (Fermentación con levadura).

Un procedimiento fermentativo similar se llevó a cabo de manera paralela sin la adición de levadura. A esta fermentación se le etiquetó como FLEVN (Fermentación levadura natural).

El tiempo cero fue considerado como la masa control (sin fermentar) para todas las fermentaciones realizadas en este estudio y etiquetada como SC.

Obtención de Extractos Metanólicos

De cada una de las muestras se obtuvieron dos extractos metanólicos siguiendo el procedimiento reportado por Salazar-López et al.(2016) este proceso se fundamenta en la solubilización de todos aquellos compuestos solubles en metanol acuoso incluyendo los compuestos fenólicos.

Se pesaron por duplicado 1 g de cada una de las muestras (FLB, FLN, FLEV, FLEVN), así como la muestra SC y fueron mezcladas con 15 mL de metanol al 80%. La mezcla fue sonicada a temperatura ambiente por 60 min. Enseguida las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm/15 min y fue separado el sobrenadante. El residuo fue sometido dos veces al mismo procedimiento de extracción descrito arriba y al final los sobrenadantes fueron colectados y filtrados en papel Whatmann Num 1. Los sobrenadantes de cada una de las muestras fueron evaporados en un rota vapor BUCHI R-100 hasta sequedad y re suspendidos en 5 mL de metanol al 50%. La concentración final de los extractos fue de 0.2 g/mL. Estos extractos fueron almacenados en tubos color ámbar a -20°C hasta las mediciones correspondientes.

Determinación de Fenoles Totales

Los compuestos fenólicos totales fueron cuantificados siguiendo la técnica propuesta por Singleton & Rossi (1965), con modificaciones para adaptar el ensayo a un lector de microplaca (FluoStar Omega, BMG Labtech Inc., Ortenberg, Alemania). Se mezclaron 30 µL de cada uno de los extractos metanólicos con 150 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido previamente 1:9 con agua desionizada) en un pocillo de

microplaca, añadiendo 120 μL de una solución de carbonato sódico (7.5%), la mezcla fue homogenizada y se dejó reaccionar en la oscuridad durante 30 minutos. El ensayo se realizó por duplicado y los cambios en la absorbancia fueron monitoreados a 765 nm contra blanco reactivo.

Para calcular la concentración de fenoles totales se elaboró una curva de calibración con ácido gálico como estándar (0.07 -1.29 mg/mL). Los resultados se expresaron como μg de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra ($\mu\text{gEAG/g}$).

Determinación de Ácido Ferúlico

El ácido ferúlico se cuantificó usando un sistema UHPLC Agilent Technologies 1260, USA) con un detector de arreglo de diodos (DAD). La separación se llevó a cabo en una columna de resolución rápida Zorbax Eclipse Plus C18 (50 mm x 2,1 mm d.i.). Se utilizó un sistema disolvente de fase binaria Fase A: agua acidificada con ácido acético (0.1%) y Fase B: metanol acidificado con ácido acético (0.1%). El gradiente de separación fue como se indica a continuación: 0 –11 min, 9 a 14% B; 11–15 min, 15% de B. El mismo gradiente permaneció por 3 min para equilibrar la columna. La temperatura de la columna se fijó a 30°C, el flujo fue de 0.7 mL/min y las lecturas de absorbancia se tomaron a 280 nm. El ensayo se realizó por duplicado y los resultados se expresaron en $\mu\text{g/g}$, de acuerdo a una curva de calibración de un estándar de ácido ferúlico (1.5 - 50 $\mu\text{g/mL}$) (Salazar-López et al. 2016).

Evaluación de la Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante en las muestras se evaluó mediante el ensayo de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). Este ensayo se basa en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catiónico $\text{ABTS}^{+\cdot}$, lo que produce un cambio en su coloración que puede cuantificarse espectrofotométricamente (Blancas-Benitez et al. 2015). Se preparó una solución stock de ABTS mezclando 5 ml de una solución acuosa de ABTS (7 mM) con 0,088 mL de persulfato sódico (148 mM), y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente

durante 16 - 18 h. La solución de trabajo ABTS*⁺ se preparó inmediatamente antes de su uso por dilución de la solución stock en etanol (~ 1: 88, v / v), y su absorbancia se ajustó a 0.7 ± 0.02 a 734 nm. En pocillos de microplaca se mezclaron 280 μ L de la solución de trabajo con 10 μ L de cada uno de los extractos y se dejó reaccionar durante 5 minutos. El ensayo se realizó por duplicado y los cambios en la absorbancia se registraron como actividad secuestrante del radical ABTS. Para expresar los resultados como μ mol equivalentes trolox por gramo de muestra fue necesario preparar una curva estándar utilizando trolox como estándar de referencia.

Preparación de Galletas de Sorgo

El diseño experimental para esta parte del estudio consistió en un diseño completamente al azar, en donde se evaluó el efecto de las distintas formulaciones de las galletas (variables independientes), sobre el contenido de fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante (variables dependientes) antes y después del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. Las formulaciones de las galletas se hicieron por duplicado y por cada duplicado se obtuvieron tres galletas (unidad experimental).

Las masas de sorgo seleccionadas para formular las galletas experimentales fueron aquellas en las que en el proceso fermentativo presentaron los valores más altos ya sea en el contenido de fenoles totales o de ácido ferúlico (FLB, FLN, FLEV y FLEVN). En total se formularon 8 galletas experimentales además de la galleta control. Las galletas fueron etiquetadas como se muestra en la Tabla 3 sin incluir aún el tiempo de cada fermentación.

Para la formulación de las galletas se siguieron las indicaciones propuestas por la AACC 10-50D (1999) con ligeras modificaciones. Primeramente, las masas seleccionadas fueron sometidas a un proceso de secado en una estufa de convección de aire a 60°C.

Las harinas obtenidas fueron utilizadas para la formulación de las galletas de acuerdo con el siguiente procedimiento: en un tazón se mezclaron 40 g de azúcar, 50 g de mantequilla, 1 g de bicarbonato de sodio, 20 g de leche en polvo desnatada, 1g de sal,

Tabla 3. Etiquetado de galletas experimentales.

Muestra	Galleta	Descripción
Mayor contenido de fenoles totales		
1	GFLB	Galleta formulada con masa FLB
2	GFLN	Galleta formulada con masa FLN
3	GLEV	Galleta formulada con masa FLEV
4	GFLEVN	Galleta formulada con masa FLEVN
Mayor contenido de ácido ferúlico		
5	GFLB	Galleta formulada con masa FLB
6	GFLN	Galleta formulada con masa FLN
7	GLEV	Galleta formulada con masa FLEV
8	GFLEVN	Galleta formulada con masa FLEVN
Control		
9	GSC	Galleta formulada con masa de sorgo sin fermentar

FLB: (Fermentación láctica por *backslopping*); **FLN** :(Fermentación láctica natural); **FLEV:** (Fermentación con levadura); **FLEVN** :(Fermentación con levadura natural).

20 mL de agua y 100 g de cada una de las harinas provenientes de las masas fermentadas. La mantequilla, azúcar, bicarbonato de sodio y sal fueron cremados manualmente por 3 min. Los ingredientes cremados fueron entonces mezclados con la harina hasta obtener una masa homogénea. La masa fue extendida con un rodillo hasta un espesor de 6mm y cortada con un molde de 25 mm de diámetro. Sobre una charola para hornear de aluminio 20 x 30, las galletas se hornearon a 180°C por 10 min y posteriormente fueron enfriadas a temperatura ambiente.

Las galletas fueron sometidas a proceso de molienda y posteriormente obtenidos los extractos metanólicos y a los cuales se les cuantifico contenido de fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante por las metodologías descritas anteriormente.

Ensayo de Digestión Gastrointestinal *in vitro*

Para determinar la bioaccesibilidad de fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante presente en las galletas formuladas con harinas provenientes de masas fermentadas de sorgo, fue necesario llevar a cabo un ensayo de simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*. El ensayo consistió en tres fases de digestión (oral, gástrica e intestinal) de acuerdo con la metodología propuesta por Bouayed, et al. 2011, con algunas modificaciones. Se describe a continuación el proceso que se siguió para la obtención de los digestos intestinales.

Fase Digestión Oral

El ensayo consistió en la participación de 9 voluntarios aparentemente sanos (un voluntario/muestra), en ayunas, masticaron por triplicado 1 g de cada una de las muestras 15 veces durante 15 segundos. Cada uno de los sujetos expulsaron el sorgo masticado hacia 9 tubos cónicos de 50 mL, posteriormente se enjuagaron la boca dos veces con 5 mL de agua durante 60 s y expulsaron el líquido hacia sus respectivos tubos. Se homogenizaron las muestras, y se mantuvieron en reposo por 2-3 min con el fin de completar la digestión en boca.

Fase Digestión Gástrica

Los tubos fueron llevados a digestión gástrica, agregando 5 mL de solución tampón HCl-KCl 0.2 M con el pH ajustado a 1.5. Luego, se agregaron 667 μ L de solución de pepsina (300 mg/mL) y se incubaron durante 1 h en un baño de agua con agitación (Precision Scientific Mod. 66800 Winchester, VA, EE. UU.), a 37 °C y 100 rpm. Posteriormente los tubos fueron conducidos hacia la siguiente fase de la digestión.

Fase Digestión Intestinal

Los tubos fueron llevados a digestión intestinal, agregando 9 mL de buffer de fosfato (0.1 M, pH 7.5) y ajustando el pH a 7.5. Posteriormente, se agregó 1 mL de solución de pancreatina (17 mg/mL) y sales biliares (80 mg), y la mezcla se incubó durante 6 h en un baño de agua con agitación a 37 °C y 100 rpm para obtener finalmente el digesto intestinal.

Los productos de la digestión intestinal y sus respectivos blancos fueron centrifugados a 6000 rpm/4°C/10 min, los sobrenadantes fueron recuperados y liofilizados. Las muestras liofilizadas se disolvieron en 5 mL de metanol al 50% y posteriormente filtradas (Econofiltr NylIn 0.25 mm 0.45 μ m, Santa Clara, CA, Estados Unidos). Los digestos fueron almacenados a – 20 °C hasta los análisis correspondientes. Cada uno de los digestos fueron analizados para contenido de fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante siguiendo los procedimientos descritos anteriormente.

La bioaccesibilidad de fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante presente en las galletas se calculó considerando el contenido de estos compuestos en la fase intestinal en relación con el contenido en las galletas antes del proceso de digestión (extracción metanólica) y considerado como el 100%, esto es tomando en cuenta que el proceso de extracción química bajo las condiciones realizadas pudo extraer el máximo contenido de compuestos fenólicos solubles (libres). Los resultados de bioaccesibilidad fueron expresados en términos de porcentaje.

Prueba de Aceptabilidad de Atributos Sensoriales de las Galletas Experimentales

Para el estudio de evaluación sensorial, se eligieron las galletas con mayor contenido de fenoles totales. Las galletas de sorgo fueron evaluadas sensorialmente mediante la prueba de aceptabilidad de los siguientes atributos: olor, color, textura, sabor y aceptabilidad general. Panelistas no entrenados (n = 98) calificaron cada uno de los atributos mediante una escala hedónica de 7 puntos, categorizados de la siguiente manera: (1) me disgusta mucho; (2) me disgusta poco; (3) me disgusta; (4) me es indiferente; (5) me gusta; (6) me gusta poco y (7) me gusta mucho. Adicionalmente los panelistas respondieron a una prueba de intención de compra del producto mediante la respuesta “Sí” (sí compraría el producto) y “No” (no compraría el producto).

Las galletas fueron etiquetadas con números aleatorios de tres dígitos y la evaluación sensorial se llevó a cabo en una sola sesión y la calificación de cada uno de los atributos se evaluó de acuerdo con la hoja de respuesta presentada en la Figura 9.

Análisis Estadístico

Los efectos del tiempo de cada una de las fermentaciones aplicadas en masas de sorgo sobre el contenido de fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante, así como para evaluar el efecto de la inclusión de harinas de masas fermentadas de sorgo en la formulación de las galletas sobre las variables respuesta antes y después del proceso de digestión gastrointestinal se realizó un análisis de varianza (ANOVA).

El efecto de la formulación de las galletas sobre cada uno de los atributos sensoriales calificados por los panelistas se evaluó mediante un ANOVA.

Las diferencias entre las medias estadísticas de las masas y galletas de sorgo, así como de los atributos sensoriales, fueron evaluadas mediante la prueba de Tukey a una $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante el paquete estadístico JMP versión 5.0.1 (EE. UU., SAS Institute, Inc).

NOMBRE _____ EDAD _____
MUESTRA _____

Califique el siguiente producto de acuerdo con la escala presentada a continuación:

1: me disgusta mucho; 2: me disgusta poco; 3: me disgusta; 4: me es indiferente; 5: me gusta; 6: me gusta poco; 7: me gusta mucho

Atributo Sensorial	1	2	3	4	5	6	7
Olor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Color	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sabor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Textura	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Apariencia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aceptabilidad general	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

¿Compraría usted habitualmente una galleta como esta?

SI

NO

Figura 9. Hoja de respuesta de aceptabilidad de atributos sensoriales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fermentación Ácido-Láctica de Masa de Sorgo

Las masas de sorgo fueron sometidas a dos procesos de fermentación ácido-láctica durante 48 horas, el primer proceso consistió en añadir un inóculo iniciador de la fermentación preparado mediante la técnica de *backslopping* (FLB) y este proceso se contrastó con otro proceso de fermentación ácido-láctica llevado a cabo de manera espontánea y bajo las mismas condiciones (FLN), y en ambos procesos el pH fue monitoreado a intervalos de 4 horas/48 h. En la Tabla 4, se muestran los cambios en el pH durante el tiempo de fermentación. Las masas FLB disminuyeron el pH en un menor tiempo comparado con las masas FLN.

El pH ácido (< 4) es uno de los indicadores de la presencia de bacterias productoras de ácido láctico, que es el principal contribuyente de esta acidificación. Ninguno de los dos procesos fermentativos logró alcanzar un $\text{pH} < 4$, no obstante, la adición de un inóculo iniciador de la fermentación aceleró el proceso de acidificación de las masas de sorgo requiriendo de 8 horas de fermentación para alcanzar un $\text{pH} = 4.44 \pm 0.01$ mientras que las masas FLN requirieron de 24 horas para alcanzar un valor similar de $\text{pH} (4.30 \pm 0.005)$.

Resultados similares fueron obtenidos por Shrivastava & Ananthanarayan. (2014) quienes usaron diferentes niveles de adición de inóculo iniciador obtenido por el procedimiento de *backslopping* para fermentar una bebida artesanal a base de sorgo llamada *idli*. En este estudio la disminución de pH fue más drástica en las muestras donde se agregaron inóculos iniciadores comparado con muestras sometidas a fermentación natural (23% vs 4.4%).

Tabla 4. Efecto del tiempo de fermentación ácido-láctica por *backslopping* (FLB) y natural (FLN) sobre el pH en masas de sorgo¹.

Horas	pH	
	FLB	FLN
0	6.33±0.015 ^a	6.72±0.025 ^a
4	5.38±0.005 ^b	6.74±0.005 ^a
8	4.44±0.01 ^c	6.71±0.015 ^a
12	4.23±0.015 ^d	6.58±0.015 ^b
16	4.18±0.01 ^d	5.25±0.025 ^c
20	4.42±0.002 ^d	5.15±0.020 ^d
24	4.17±0.025 ^d	4.30±0.005 ^f
28	4.26±0.005 ^d	4.49±0.002 ^e
32	4.23±0.001 ^d	4.12±0.005 ^g
36	4.25±0.001 ^d	4.20±0.005 ^f
40	4.19±0.005 ^d	4.24±0.015 ^f
44	4.05±0.002 ^e	4.23±0.015 ^f
48	4.04±0.045 ^e	4.15±0.051 ^g

¹Los valores corresponden al promedio ± error estándar (n=8). Superíndices diferentes en cada columna representan diferencia estadísticamente significativa (p<0.05).

En otro estudio realizado por Taylor & Taylor (2002), se fermentaron cinco variedades de sorgo (decorticado), usando el método de *backslopping*, los resultados mostraron un patrón idéntico para las cinco variedades de sorgo en cuanto a la reducción del pH, con un pH inicial de 6.5 hasta 3.5 al segundo día para después mantenerse sin cambios significativos.

Por otra parte, cabe señalar que diversos estudios han demostrado que un proceso de fermentación en cereales puede verse retrasado cuando el sustrato alimenticio a fermentar es un grano entero, lo anterior debido a que la cobertura de la semilla (pericarpio) que funciona como una cobertura protectora del grano, posee agentes antimicrobianos que pueden inhibir la actividad de algunos microorganismos fermentadores, repercutiendo en una menor disminución de pH (Adebiyi, Njobeh, & Kayitesi, 2019; Bhanja Dey & Kuhad, 2014).

Un estudio llevado a cabo por Mohammed et al. (1991), describe el comportamiento de las proporciones microbianas en grano de sorgo durante la fermentación para la obtención de *kisra*, mencionan que de manera natural es posible encontrar colonias bacterianas de los géneros *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacilos*, levaduras y mohos. Una vez que el sorgo es sometido a proceso de fermentación, el crecimiento de estos microorganismos puede ser muy variable dependiendo de si es fermentación natural o por *backslopping*.

En condiciones naturales estas poblaciones de microorganismos se encuentran en baja proporción, sin embargo, cuando la fermentación progresa esta se incrementa predominando bacterias ácido lácticas en detrimento del crecimiento de *Enterobacteriaceae* (no crecen en medio ácido). Los mohos y levadura incrementan su crecimiento hasta el final de la fermentación, sin embargo, cuando se hacen subsecuentes fermentaciones tanto los mohos como las levaduras mantienen su crecimiento. Por otra parte, las bacterias ácido lácticas del género *Lactobacilos* (*L. brevis* y *L. confusus*) se encuentran a lo largo de la fermentación original y las sucesivas mientras que coliformes no son detectadas en las subsecuentes fermentaciones. Se observa que las bacterias del género *Pediococcus* (*P.*

pentosaceus), mantienen alta su población y dominan en las fermentaciones. Es importante resaltar que estos patrones de crecimiento pueden variar dependiendo del tipo de producto fermentado, por ejemplo, se han aislado de sorgo especies de lactobacilos altamente productores de ácido láctico como *L. reuteri*, *L. casei*, *L. harbinensis*, *L. parabuchneri* y *L. corinyformis* de masas de sorgo destinadas a la producción de *ting*, un alimento tradicional de Africa (Sekwati-Monang et al., 2012).

La técnica de *backslopping* es una práctica común en una gran variedad de procesos fermentativos de tipo artesanal, y es importante señalar que este tipo de procedimiento es básicamente un proceso heterofermentativo, dominada principalmente por bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* (Vrancken et al., 2011).

Poutanen et al. (2009) establece que, durante el proceso de fermentación, regularmente a las 24 horas y temperatura moderada, la actividad metabólica de los microorganismos presentes se encuentran en interacción con los constituyentes del grano. Las bacterias ácido-lácticas producen ácidos láctico y acético, reduciendo el pH regularmente por debajo de 5. Las levaduras producen dióxido de carbono y etanol. Las interacciones entre levaduras y lactobacilos y las condiciones cambiantes durante la fermentación, tales como, el ajuste del pH, contribuyen a la activación selectiva de enzimas como amilasas, proteasas, hemicelulasas y fitasas. Las enzimas y los metabolitos microbianos inducen cambios asociados a efectos tecnológicos y nutricionales de los cereales.

Diversos estudios han demostrado que el proceso fermentativo asociado a bacterias ácido-lácticas promueve cambios estructurales en la matriz alimentaria, estos cambios conducen a modificación en el contenido de componentes como proteínas, grasas, carbohidratos y también en otros componentes no nutrientes como los compuestos fenólicos (Elkhalifa et al. 2005; Schober, Bean, & Boyle, 2007; Thiele, Grassl, & Gänzle, 2004). Estos cambios pueden ser promovidos por enzimas presentes ya sea en las masas a fermentar o bien sintetizadas por los propios microorganismo (Kirsi-Helena Liukkonen, Kati Katina, Annika Wilhelmsson, Olavi Myllymaki, 2003).

En la Figura 10, se muestra el efecto del tiempo de fermentación ácido-láctica en masas de sorgo por el procedimiento de *backslopping* (FLB) y por fermentación natural (FLN) sobre el contenido de fenoles totales. Se puede observar que, en los dos procesos fermentativos, el contenido de fenoles totales mostró fluctuaciones durante las primeras 28 horas. A partir de este tiempo se observó un incremento significativo de fenoles totales en las masas ($p < 0.05$), llegando a un máximo de $700.9 \pm 7.6 \mu\text{gEAG/g}$ a las 36 h en FLB y de $484.79 \pm 6.1 \mu\text{gEAG/g}$ en FLN a las 48 h, correspondiendo incrementos del 86% y 28% con respecto a la masa de sorgo control ($t = 0$ h).

En la Figura 11 se muestran los cambios en el contenido de ácido ferúlico durante el tiempo de fermentación. Comparando con la masa sin fermentar (SC, $t = 0$ h), se puede observar en las masas FLB y FLN, un incremento significativo de ácido ferúlico durante las primeras horas de fermentación. En el caso de la masa con inóculo añadido (FLB) el contenido de ácido ferúlico se incrementó desde $6.66 \pm 0.23 \mu\text{g/g}$ hasta $21.25 \pm 0.27 \mu\text{g/g}$ a 20 horas de fermentación (+219%), mientras que para las masas FLN se alcanzó una máxima concentración de ácido ferúlico de $18.14 \pm 0.12 \mu\text{g/g}$ a 12 horas de fermentación (+172%). Posterior a estos tiempos, la concentración de ácido ferúlico disminuyó considerablemente en ambos procesos, pero siempre manteniéndose los valores más altos de este compuesto fenólico en las masas FLB.

La actividad antioxidante en las masas de sorgo FLN mostraron desde el inicio valores más altos de actividad antioxidante presentando valores máximos a 4, 8 y 12 horas de fermentación, a partir de este tiempo los valores disminuyeron significativamente. En las masas FLB la actividad antioxidante mostró su máximo valor a las 4 horas de fermentación ($5.52 \pm 0.03 \mu\text{molET/g}$) posterior a este tiempo se presentó una reducción en los valores mostrando un comportamiento muy similar a masas FLN incluso alcanzando valores al término del proceso fermentativo menores a los presentados en las masas sin fermentar (Figura 12).

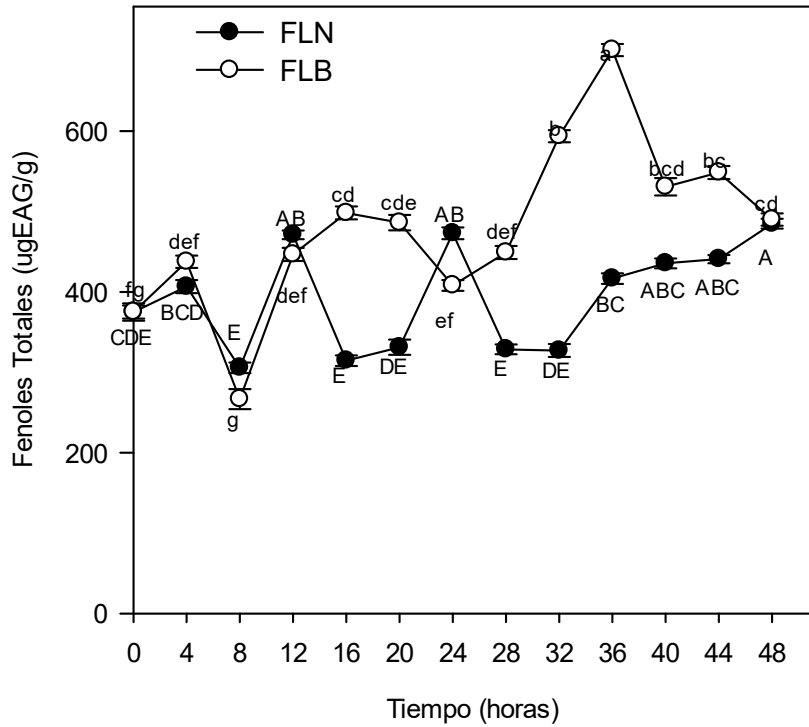


Figura 10. Efecto del tiempo de fermentación ácido-láctica de masas de sorgo sobre el contenido de fenoles totales. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar ($n=8$). FLN: fermentación ácido-láctica natural; FLB: fermentación ácido-láctica por *backslopping*. Literales minúsculas y mayúsculas diferentes para FLB y FLN respectivamente representan diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$).

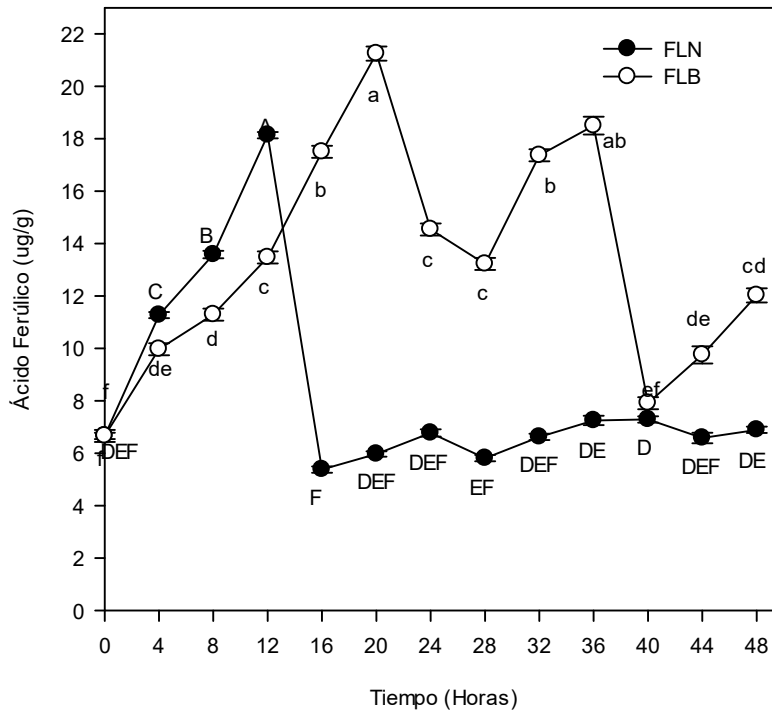


Figura 11. Efecto del tiempo de fermentación ácido-láctica de masas de sorgo sobre el contenido de ácido ferúlico. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar ($n=8$). FLN: fermentación ácido-láctica natural; FLB: fermentación ácido-láctica por *backslopping*. Literales minúsculas y mayúsculas diferentes para FLB y FLN respectivamente representan diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$).

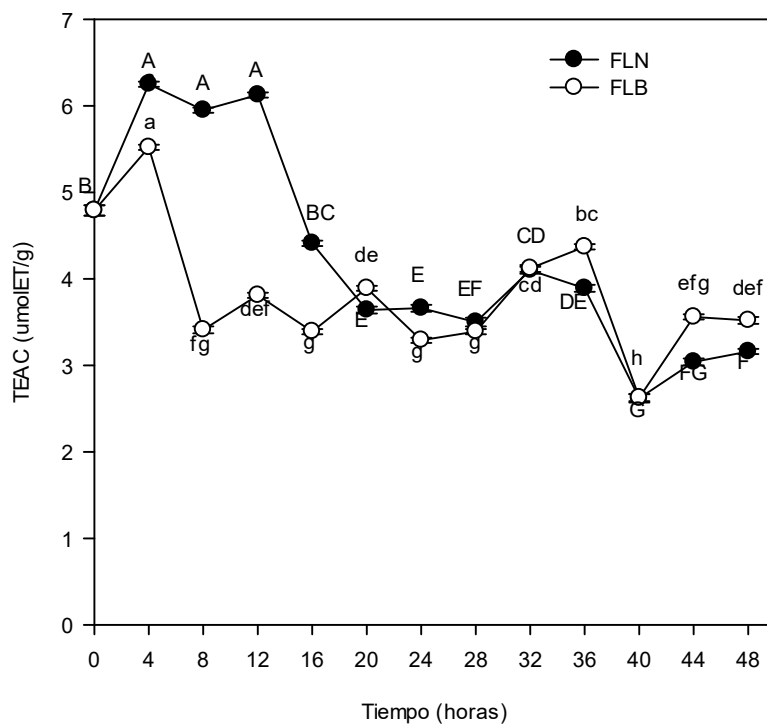


Figura 12. Efecto del tiempo de fermentación ácido-láctica de masas de sorgo sobre la actividad antioxidante. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar (n=8). FLN: fermentación ácido-láctica natural; FLB: fermentación ácido-láctica por *backslopping*. Literales minúsculas y mayúsculas diferentes para FLB y FLN respectivamente representan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

En los estudios del efecto de la fermentación sobre el contenido de fenoles totales, individuales y actividad antioxidante en granos en sorgo (Adebo et al., 2018; Dlamini et al., 2007; Mohapatra et al., 2019; N.J. Salazar-López et al., 2017) y en otros cereales como trigo, maíz, quinoa, centeno entre otros (Dordević et al., 2010; Katina, Liukkonen, et al., 2007; Kirsi-Helena Liukkonen, Kati Katina, Annika Wilhelmsson, Olavi Myllymaki, 2003; Salazar-Lópes et al., 2016), se han observado incrementos/reducciones que se han atribuido a diversos factores, tales como, tipo y cultivar de sorgo a fermentar, condiciones de fermentación, tipo de fermentación entre otros. Estos factores determinan la naturaleza del metabolismo que se activará por parte de los microorganismos participantes. En la mayoría de estos estudios los efectos se cuantifican al final del proceso de fermentación, dejando cierta incertidumbre en relación al comportamiento de estos compuestos a lo largo de la fermentación.

De tal manera que, en nuestro estudio, resultó relevante monitorear el contenido de fenoles, ácido ferúlico y actividad antioxidante y detectar que en algunos intervalos de tiempo estas variables respuestas aumentaron mientras que en otros intervalos disminuyeron.

Fermentación Alcohólica con Adición de Levadura en Masas de Sorgo

Se llevó a cabo un experimento independiente de fermentación alcohólica de masa de sorgo con y sin levadura añadida y se evaluaron los efectos sobre el contenido de fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante a lo largo de ambos procesos de fermentación.

En la Figura 13 se observa que las masas sometidas a fermentación con levadura (FLEV) presentaron el mayor contenido de fenoles totales comparado con masas de sorgo sin levadura añadida (FLEVN). En FLEV el mayor contenido de fenoles totales se observó desde los 30 min de fermentación ($598.12 \pm 17.0 \mu\text{g EAG/g}$) manteniéndose los valores constantes hasta los 120 min, a partir de este tiempo se

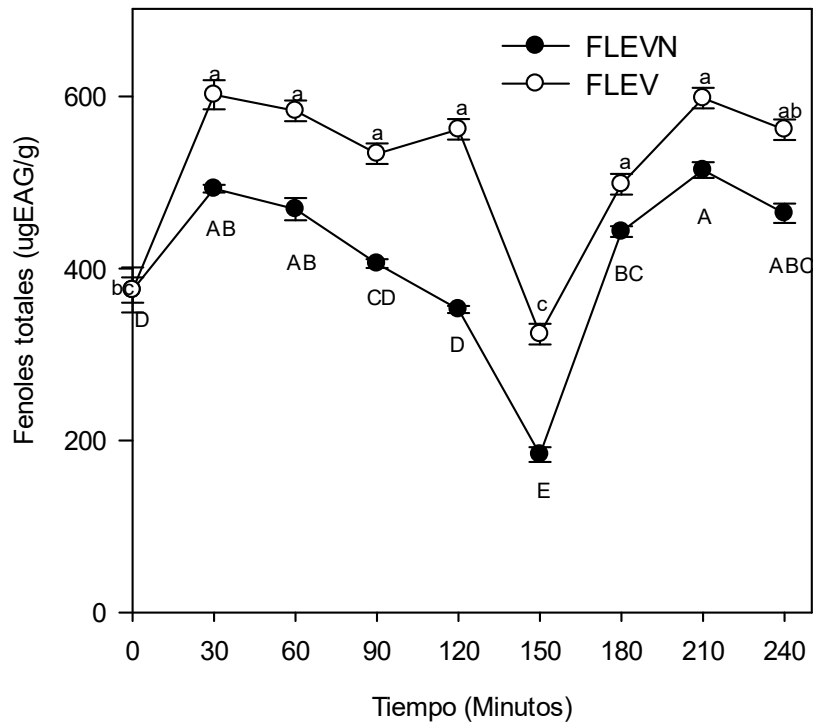


Figura 13. Efecto del tiempo de fermentación de masas de sorgo con y sin levadura añadida sobre el contenido de fenoles totales. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar (n=8). Literales minúsculas y mayúsculas diferentes para FLEV y FLEVN respectivamente representan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

observó una disminución en el contenido de fenoles totales, para posteriormente volver a incrementarse hasta el término del proceso fermentativo.

Un comportamiento similar se presentó en las masas fermentadas de manera natural (FLEVN) pero en este caso los valores de fenoles totales se mostraron más bajos comparados con FLEV, y el máximo contenido se observó a los 210 min de fermentación ($514.5.96 \pm 9.19 \mu\text{g EAG/g}$). Tanto en FLEV como en FLEVN, el contenido de fenoles totales fue más alto comparado con las masas sin fermentar siendo el incremento del orden del 58% y 37% para FLEV y FLEVN, respectivamente.

En la Figura 14, se puede observar que el ácido ferúlico mostró sus valores más altos a los 210 min ($15.02 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$) y 150 min ($14.2 \pm 0.13 \mu\text{g/g}$) para masas FLEV y FLEVN, respectivamente. En ambos casos, el contenido de ácido ferúlico se mostró más alto respecto a las masas sin fermentar. La Figura 15 muestra el comportamiento de la actividad antioxidante durante el proceso de fermentación, se observó que desde el inicio del proceso fermentativo la actividad antioxidante redujo significativamente sus valores para posteriormente mantenerse con valores constantes hasta el término de la fermentación.

Existen escasos estudios sobre la evaluación del efecto de la adición de levadura panaria a masas de sorgo sobre el contenido de fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante. Algunos estudios han evaluado el efecto de manera conjunta de la fermentación ácido láctica y alcohólica sobre el contenido de fenoles totales, en masas diferentes al sorgo, tal es el caso del estudio presentado por Katina, Liukkonen, et al., (2007) quienes evaluaron la influencia de las condiciones de fermentación y tipo de salvado de centeno (obtenido de granos centeno nativo y sin cascarilla) sobre compuestos fenólicos, y observaron que el contenido de fenoles totales incrementó de manera lineal con respecto a la temperatura y tiempo de fermentación, y que este incremento fue más evidente en salvado proveniente de granos de centeno nativo. El ácido ferúlico también mostró su mayor concentración durante la fermentación de salvado nativo, a condiciones variables de fermentación.

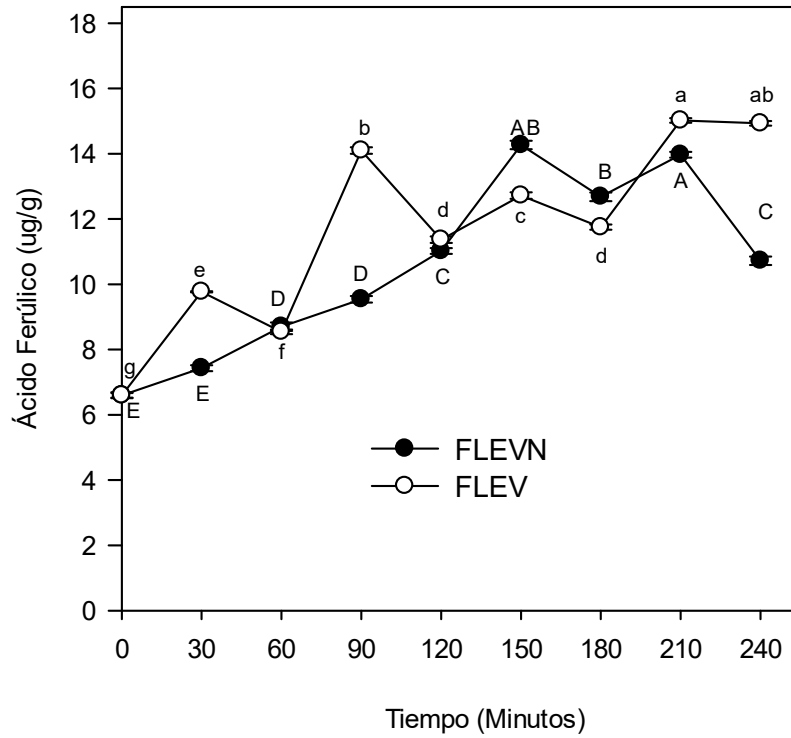


Figura 14. Efecto del tiempo de fermentación de masas de sorgo con y sin levadura añadida sobre el contenido de ácido ferúlico. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar (n=8). FLEVN: fermentación natural; FLEV: fermentación con levadura añadida. Literales minúsculas y mayúsculas diferentes para FLEVN y FLEV respectivamente representan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

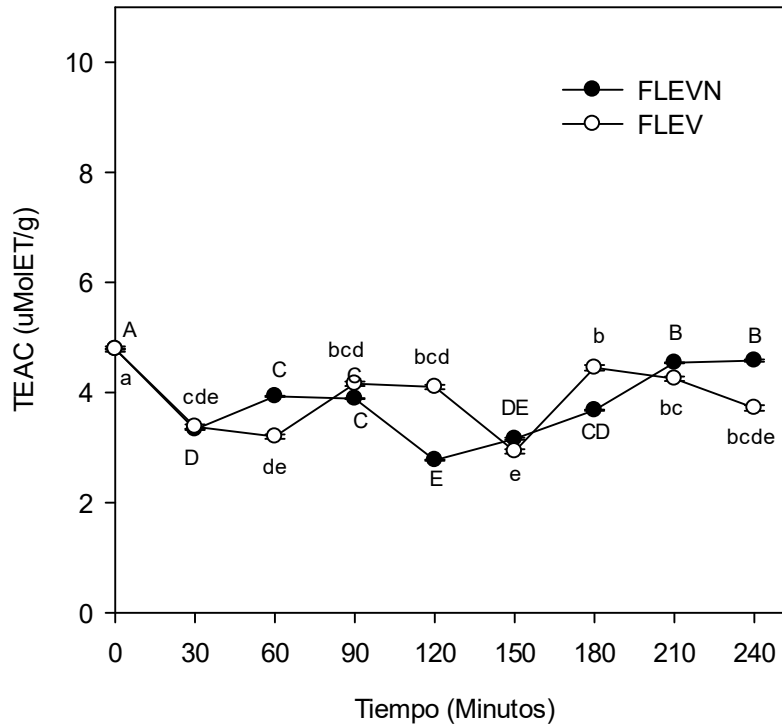


Figura 15. Efecto del tiempo de fermentación de masas de sorgo con y sin levadura añadida sobre la actividad antioxidante. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar ($n=8$). FLEVN: fermentación natural; FLEV: fermentación con levadura añadida. Literales minúsculas y mayúsculas diferentes para FLEVN y FLEV respectivamente representan diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$).

En nuestro estudio en particular, el proceso de fermentación con levadura añadida tuvo una duración de cuatro horas (240 min) y a temperatura de fermentación de 36°C, tratando de simular un proceso de fermentación panaria, siendo poco probable que a este tiempo se haya presentado la fermentación ácido-láctica.

Por otra parte, considerando que el proceso de fermentación con levadura, no promueve reducciones en el pH en las masa, se ha reportado que bajo estas condiciones de fermentación el ácido ferúlico puede incrementar su concentración, debido a que el pH >7 se considera un valor óptimo para la actividad de cinamoil esterases (Boskov Hansen et al., 2002).

De acuerdo a Dornez et al. (2006), se ha reportado que cerca del 90% de la actividad endoxilanasas se origina a partir de microorganismos presentes en la corteza del grano, por lo tanto, pudiera ser posible una degradación de las paredes celulares, la cual pudo haber sido de mayor intensidad si se añadió levadura al sistema de fermentación como fue en el caso de FLEV.

Cabe mencionar, que el incremento en el contenido de fenoles en las masas también pudo ser atribuido a reacciones de proteólisis por parte del microorganismo, lo que pudo conducir a liberación de aminoácidos, compuestos que también pueden dar positiva la reacción de Folin. Todos los procesos de fermentación evaluados promovieron incremento de fenoles totales y ácido ferúlico en relación con la masa control. En particular, el proceso de fermentación por *backslopping* resultó ser más efectivo en cuanto a incremento de fenoles totales y ácido ferúlico respecto a la fermentación alcohólica con adición de levadura. La adición de inóculo y de levadura a los respectivos procesos fermentativos determinó un incremento en el contenido de estos componentes con relación a su contraparte.

Dado que el presente trabajo no trata sobre un estudio de optimización, resulta difícil, establecer el mejor tiempo y/o tipo de fermentación para la máxima obtención de compuestos fenólicos y ácido ferúlico. Lo anterior resulta relevante particularmente porque se presentaron fluctuaciones en los contenidos de fenoles totales y ácido ferúlico a lo largo del proceso de fermentación y en algunos casos, tiempos altos sin

diferencias significativas. De tal manera que para continuar con el siguiente objetivo de este estudio se consideraron los valores más altos de contenido de compuestos fenólicos y ácido ferúlico encontrados en las masas (Tabla 5).

Bioaccesibilidad de Fenoles Totales, Ácido Ferúlico y Actividad Antioxidante en Galletas Formuladas con Harina de Masas Fermentadas de Sorgo

Con los resultados obtenidos anteriormente, se procedió a la elaboración de las galletas, eligiendo ocho formulaciones, de las cuales, cuatro fueron con harina de masa de sorgo fermentada con bacterias ácido-lácticas y levadura al tiempo que resultó con mayor contenido de fenoles totales (FLB_(36 h), FLN_(48 h), FLEV_(30 min) y FLEVN_(210 min)) y en las otras cuatro se usó harina de masa fermentada al tiempo que resultó con el mayor contenido de ácido ferúlico (FLB_(20 h), FLN_(12 h), FLEV_(210 min) y FLEVN_(150 min)). Adicionalmente se formularon galletas a partir de masa de sorgo sin fermentar (GSC) como galleta control.

Tanto a las galletas experimentales como a la galleta control, se les evaluó el contenido de fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante, esto con el fin de observar un posible efecto de la formulación de las galletas con las harinas provenientes de cada una de las masas fermentadas, así como también, para usarlos como referencia en el estudio de la bioaccesibilidad de los fenoles totales y del ácido ferúlico.

En la Tabla 6 se muestra el contenido de fenoles totales y ácido ferúlico en los digestos de las ocho galletas experimentales, así como en la galleta control. Los datos corresponden a los extractos metanólicos antes y después del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*.

Tabla 5. Tiempos de fermentación en masas de sorgo que mostraron los valores más altos de fenoles totales y ácido ferúlico.

Muestra	Fenoles Totales		Ácido Ferúlico	
	Tiempo	$\mu\text{gEAG/g}$	Tiempo	$\mu\text{g/g}$
SC	0	375 ± 8.1	0	6.66 ± 0.12
Fermentación Ácido-Láctica				
FLB	36(h)	700.9 ± 7.6	20(h)	21.2 ± 0.27
FLN	48(h)	484.7 ± 6.1	12(h)	18.1 ± 0.12
Fermentación con Levadura				
FLEV	30(min)	602.2 ± 17.0	210(min)	15.02 ± 0.07
FLEVN	210(min)	514.5 ± 9.19	150(min)	14.27 ± 0.13

SC: masa de sorgo control

FLB: fermentación ácido-láctica por backslopping

FLN: fermentación ácido-láctica natural

FLEV: fermentación alcohólica con levadura añadida

FLEVN: fermentación alcohólica natural

Tabla 6. Contenido de fenoles totales y ácido ferúlico en galletas formuladas a partir de harinas de masas fermentadas de sorgo antes y después del proceso de simulación de digestión intestinal *in vitro*.

Galleta	Fenoles totales µgEAG/g		Ácido Ferúlico µg/g	
	Fracción Metanólica			
	Antes de Digestión Intestinal	Después de Digestión Intestinal	Antes de Digestión Intestinal	Después de Digestión Intestinal
GSC	1174.92±29.19 ^C	5385.17±169.4 ^B	6.35±0.87 ^C	0.22±0.02 ^C
Fermentación Ácido-Láctica				
GFLB _(36 h)	985.2±33.71 ^C	6371.5±182.9 ^A	25.90±0.75 ^A	1.41±0.16 ^B
GFLB _(20 h)	1029.19±33.71 ^C	5562.8±149.4 ^B	22.30±0.10 ^{AB}	1.62±0.004 ^A
GFLN _(48 h)	1344.12±26.11 ^A	7149.8±149.4 ^A	26.97±1.70 ^A	1.59±0.21 ^A
GFLN _(12 h)	1126.10±26.11 ^B	7194.4±169.4 ^A	24.12±3.64 ^A	1.60±0.27 ^A
Fermentación con Levadura				
GFLEV _(30 min)	1130.5±32.9 ^{AB}	5870.4±156.07 ^B	13.11±2.25 ^B	1.13±0.17 ^A
GFLEV _(210 min)	1322.2±30.5 ^A	6511.9 ±156.0 ^A	22.74±1.41 ^A	0.76±0.06 ^{AB}
GFLEVN _(210 min)	926.3±48.9 ^C	6854.5±156.07 ^A	22.69±1.56 ^A	1.11±0.08 ^A
GFLEVN _(150 min)	1000.45±48.6 ^{BC}	5354.1±168.5 ^B	25.56±3.87 ^A	1.16±0.02 ^{AB}

Los valores corresponden a la media ± error estándar (n=8). Medias con superíndices diferentes por columna y para cada tipo de fermentación son estadísticamente diferentes (p<0.05). GSC: galleta formulada con harina de masa de sorgo sin fermentar; GFLB_(20 h) y GFLB_(36 h): galletas formuladas a partir de harina de masa de sorgo sometida a fermentación ácido-láctica por la técnica de backslopping por 20 y 36 horas, respectivamente. GFLN_(12 h) y GFLN_(48 h): galletas formuladas con harina de masa de sorgo sometida a fermentación natural por 12 y 48 horas, respectivamente. GFLEV_(30 min) y GFLEV_(210 min): galletas formuladas con harina de masa de sorgo sometida a fermentación alcohólica con levadura añadida por 30 y 210 minutos, respectivamente. GFLEVN_(150 min) y GFLEVN_(210 min): galletas formuladas con harina de masa de sorgo sometida a fermentación alcohólica natural por 210 y 150 minutos, respectivamente

De acuerdo con estos resultados, cabe resaltar primeramente que en todas las galletas analizadas (antes de la digestión intestinal) se observó un incremento considerable en el contenido de fenoles totales y ácido ferúlico al comparar con el contenido reportado en sus respectivas masas (Ver Tabla 5), pudiendo sugerir que el proceso de horneado favoreció la liberación y/o formación de estos compuestos.

El contenido de fenoles totales y ácido ferúlico en las galletas experimentales del grupo GFLB (antes de la digestión intestinal), no mostraron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales comparado con las galletas control (GSC) ($p > 0.05$). Las galletas GFLN, presentaron valores más altos de fenoles totales comparando con GFLB y GSC, siendo la GFLN_(48 h) la que mostró un mayor contenido en fenoles totales ($1344.12 \pm 26 \mu\text{g EAG/g}$) superando con un 30% a las galletas GSC.

En el caso de galletas formuladas con harina de masas fermentadas con levadura (GFLEV), a 30 min y 210 min de fermentación, mostraron valores superiores (10-15%) comparado con GSC. La inclusión de harinas de masa fermentada por proceso natural en la formulación de las galletas no afectó el contenido de fenoles totales mostrándose estadísticamente iguales ($p > 0.05$) a los presentados por las GSC.

El contenido de ácido ferúlico se incrementó de manera significativa en todas las galletas experimentales. Los valores de ácido ferúlico oscilaron en el rango de $22.30 \pm 0.10 \mu\text{g/g}$ hasta $26.97 \pm 1.70 \mu\text{g/g}$. Estos contenidos superaron con alrededor del 250% a lo cuantificado en GSC.

Para las galletas formuladas con harina de masa fermentada con levadura, y a excepción de GFLEV_(30 min), el contenido de ácido ferúlico fue significativamente más alto en GFLEV_(210 min), GFLEVN_(210 min), GFLEVN_(150 min), comparado con respecto a GSC.

Durante el proceso de horneado se presenta la posibilidad de reacción de grupos amino libres de lisina, péptidos ó proteínas con grupos carbonilos de carbohidratos reductores por medio de la reacción de Maillard. Siendo la reacción de Maillard un evento sumamente complejo basado en una serie de reacciones es posible simplificarla en tres etapas: inicial, intermedia y avanzada. en cada etapa se forman

diferentes estructuras químicas. Durante el proceso de horneado en cereales ha sido estudiada la producción de furosina como un producto inicial de la reacción de Maillard, posteriormente conforme la reacción avanza se obtienen compuestos más complejos denominados MRPs (Maillard reaction products), los cuales se caracterizan por ser fluorescentes y con cierto grado de entrecruzamiento. Las melanoidinas son los productos finales de la reacción de Maillard (Delgado-Andrade, Rufián-Henares, & Morales, 2005; Silván et al., 2011). Los productos de la reacción de Maillard se presentan durante el proceso de horneado, y esto desde el punto de vista tecnológico induce a cambios positivos en el producto final tales como mejoramiento del color, sabor y textura. Sin embargo, existe muy poca información en relación a la contribución de estos productos de la reacción de Maillard al potencial biológico de los productos.

Un estudio llevado a cabo por Michalska, Amigo-Benavent, Zielinski, & del Castillo, (2008), atribuyó el incremento de fenoles totales en panes formulados a partir de harina de centeno a los productos de la reacción de Maillard. Lo anterior debido a que estos productos dan positivo a la reacción de Folin Ciocalteu.

No obstante, también es posible que otros eventos atribuidos al tratamiento térmico además de las reacciones de Maillard hayan contribuido al incremento de fenoles totales y ácido ferúlico, tal es el caso del estudio reportado por Dewanto, Wu, & Liu (2002), quienes estudiaron el efecto del proceso de cocción de maíz dulce sobre el contenido de fenoles totales libres y ácido ferúlico. Encontraron que a una temperatura de cocción de 121°C/25 min, se incrementaron los fenoles totales y ácido ferúlico en su forma libre en la medida que disminuyeron en su fracción ligada, comparado con maíz sin procesamiento.

Hithamani & Srinivasan. (2014) llevaron a cabo un estudio sobre los efectos de la aplicación de tratamientos térmicos en sorgo sobre compuestos fenólicos. Tratamientos térmicos como el rostizado, cocimiento a presión, cocción sin presión y calentamiento por microondas, promovieron incrementos significativos de ácido ferúlico, mientras que solo el rostizado (150°C/20 min) promovió hasta un 50% de

incremento de fenoles totales. Los incrementos fueron atribuidos a la liberación de fenoles ligados de la pared celular, degradación de polifenoles conjugados e incrementando la extractabilidad de los fenoles posterior al rostizado. Este tipo de tratamientos junto con el horneado caen dentro del grupo de tratamientos térmicos en ausencia de agua, en donde se ha sugerido que además de los productos de la reacción de Maillard que contribuyen al incremento de compuestos fenólicos, también es posible que se presente ruptura de las paredes celulares durante el horneado contribuyan a este efecto (Michalska et al., 2008).

La extracción metanólica como parte del proceso metodológico previo a la cuantificación de fenoles totales y ácido ferúlico permite bajo las condiciones establecidas extraer la mayor cantidad de fenoles totales y ácido ferúlico en su forma libre, es decir en la forma química en la que pueden estos compuestos estar accesibles en el alimento.

No obstante, es relevante mencionar que los valores reportados como fracción metanólica (antes de la digestión), no necesariamente van a ser el reflejo de lo que pueda suceder cuando este producto es sometido a un proceso de digestión gastrointestinal, ya que las condiciones digestivas ejercen otro tipo de reacciones muy diferentes a las que se presentan en una extracción química, lo que puede conducir a que los compuestos fenólicos que se encontraban accesibles en la matriz alimentaria ya no sean detectados, posiblemente atribuido a degradación de los mismos o interacción con otros componentes que impidan su liberación.

Por otro lado, es posible también que las condiciones de digestión puedan favorecer de manera significativa la liberación de compuestos fenólicos, es decir que los procesos enzimáticos y cambios de pH puedan promover liberación de compuestos fenólicos que en la muestra antes de la digestión se encontraban ligados o conjugados o atrapados físicamente en la matriz alimentaria.

De acuerdo con lo anterior, para este estudio se evaluó el efecto del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* de 1 g de cada una de las galletas sobre el contenido de fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante. Cabe mencionar que el

ensayo completo de digestión gastrointestinal fue con la finalidad de obtener digestos intestinales, los cuales son considerados los de mayor interés, dado que es en esta etapa de la digestión en donde se presenta la máxima absorción de los productos de la digestión de alimentos (Shahidi & Peng, 2018).

En la Tabla 6, se muestra que el proceso de digestión intestinal promovió cambios importantes en el contenido de fenoles totales y ácido ferúlico presentes en las galletas, particularmente, los fenoles totales se incrementaron de manera significativa en los digestos de las galletas experimentales incluyendo la galleta control.

El contenido de fenoles totales en los digestos de galletas formuladas con harinas de masas de sorgo fermentadas a 36 h, 48 h y 12 h se mostró más alto que el encontrado en digesto de la GSC.

En los digestos de las galletas formuladas con harina de masa fermentada con levadura, se observó que la GFLEV_(210 min) mostró los valores más altos de fenoles totales ($6511.9 \pm 156.0 \mu\text{g EAG/g}$) incrementando hasta un 18% respecto a la GSC, mientras que en los digestos del grupo de las galletas fermentadas sin levadura las muestras GFLEVN_(210 min) fue la que presentó el valor más alto de fenoles totales ($6854.5 \pm 156.07 \mu\text{g EAG/g}$) con un incremento del 25% respecto a la GSC.

El contenido de ácido ferúlico presente en los digestos de las galletas evaluadas mostró una drástica reducción respecto a las muestras antes de la digestión. Sin embargo, el contenido de ácido ferúlico fue significativamente más alto en todos los digestos de las las galletas experimentales comparando con GSC, observándose los valores más altos en digestos de galletas GFLB_(20 h) y en GFLN_(48 h) y GFLN_(12 h).

Es conocido que el tipo de alimento y procesamiento son dos de los principales factores que afectan el tipo y cantidad de compuestos fenólicos en alimentos. Una vez ingeridos, los efectos saludables derivados de los compuestos fenólicos dependen del grado en que son liberados de la matriz, absorbidos en el tracto gastrointestinal y disponibles para el metabolismo. La bioaccesibilidad es la fracción del compuesto que es liberado de la matriz durante la digestión y que está disponible para la absorción en el intestino delgado (Ribas-Agustí et al., 2018).

El cálculo de la bioaccesibilidad en términos de porcentaje puede resultar un indicador de la cantidad de un compuesto bioactivo que puede potencialmente ser absorbido en el intestino (Alminger et al 2014). Particularmente cuando las concentraciones de compuestos fenólicos presentes en la matriz alimentaria previo a la digestión son diferentes para cada muestra evaluada, como lo es en el caso de nuestro estudio, es necesario uniformizar los valores en términos de porcentaje, de tal manera que las concentraciones tanto de fenoles totales como de ácido ferúlico, así como, la de actividad antioxidante presentes en la muestra original son tomadas como el 100% es decir el máximo porcentaje que se puede extraer de estos componentes en su forma libre.

En la Figura 16 se muestran los resultados de bioaccesibilidad *in vitro* de los fenoles totales presentes tanto en las galletas GSC como en las experimentales, se observa primeramente que todas las galletas evaluadas incluyendo la GSC superaron el 100% de bioaccesibilidad de fenoles totales, es decir que el proceso de digestión gastrointestinal promovió la liberación de estos compuestos en un porcentaje mayor al reportado en las muestras antes de la digestión.

En cuanto al efecto de la inclusión en la formulación de harinas de masas de sorgo sometidas a fermentación ácido-láctica se observó que estas galletas superaron el porcentaje de bioaccesibilidad de las galletas control (GSC). Las galletas GFLB_(36 h) y GFLN_(12 h) mostraron los mayores porcentajes de bioaccesibilidad de fenoles totales (646.0% y 638.0% respectivamente). Por otra parte, en el grupo de galletas formuladas con masas fermentadas con y sin levadura, se observó un incremento menor en el porcentaje de bioaccesibilidad a excepción de GFLEVN_(210 min) que presentó los más altos valores de bioaccesibilidad para todas las galletas evaluadas.

Con relación a la bioaccesibilidad de ácido ferúlico en galletas es posible observar en primer término que ninguna de las galletas formuladas con FLB y FLN así como tampoco la galleta control lograron superar el 100% de bioaccesibilidad de ácido ferúlico comparado con las galletas antes del proceso de digestión (Figura 17).

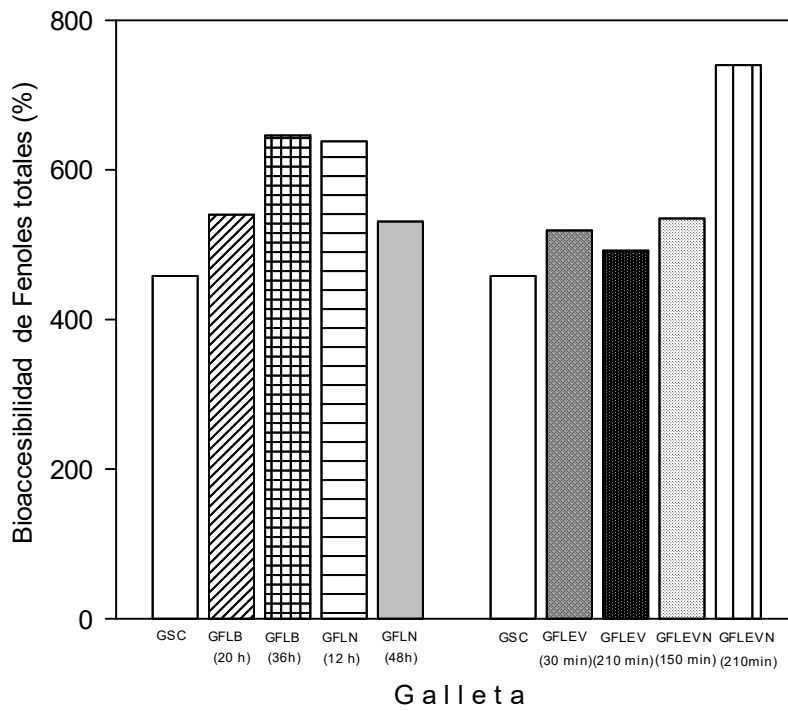


Figura 16. Bioaccesibilidad (%) de los fenoles totales de las galletas formuladas con harina de masas sometidas a diferentes procesos fermentativos.

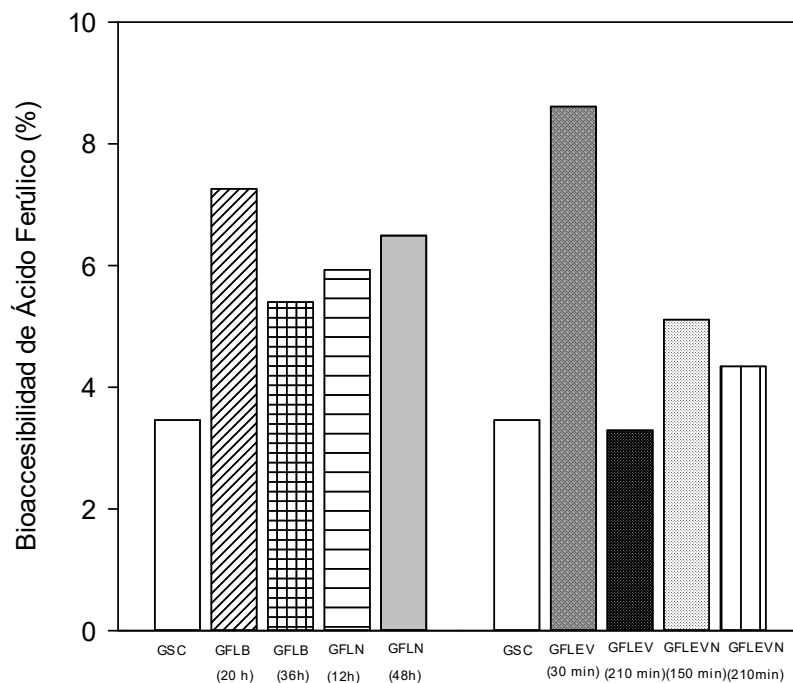


Figura 17. Bioaccesibilidad (%) del ácido ferúlico presente en galletas formuladas con masas sometidas a diferentes procesos fermentativos.

No obstante, los valores bajos de bioaccesibilidad, se observó un efecto positivo en cuanto a que las galletas formuladas con las harinas de masas fermentadas por *backslopping* o natural, mostraron valores más altos de bioaccesibilidad respecto a la galleta control. Similares resultados se presentaron en las galletas FLEV y FLEVN, pero e menor magnitud a excepción de la galleta GFLEV_(30 min) que mostró las más alta bioaccesibilidad respecto al resto de las galletas evaluadas.

Un mecanismo presumible para el aumento inducido por la fermentación en la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos pudiera ser que las enzimas degradantes presentes tanto en los granos como en los microorganismos dieron como resultado la descomposición estructural de la matriz de la pared celular, lo que aumentó la accesibilidad de los compuestos fenólicos unidos y conjugados al ataque enzimático (Dordević et al. 2010). Además, la síntesis o transformación enzimática de varios compuestos bioactivos puede ocurrir durante los procesos de fermentación (Katina, Liukkonen, et al. 2007). Los efectos de la fermentación sobre los compuestos fenólicos dependen principalmente de los tipos de granos (Dordević et al., 2010), especies de microorganismos (Dordević et al., 2010; Kariluoto et al., 2006; Katina, Laitila, et al., 2007) y las condiciones de fermentación, en particular la temperatura, el pH y el tiempo (Boskov Hansen et al. 2002).

Bioaccesibilidad de la Actividad Antioxidante

Los compuestos bioactivos como los fenoles ejercen diferentes efectos en beneficio de la salud humana, los mecanismos a los que pueden atribuirse estos efectos van desde actividad antimutagénica, anticancerígena, antiinflamatoria entre otros. Uno de los mecanismos más ampliamente estudiados es la actividad antioxidante, es decir la capacidad que presentan para donar un átomo de hidrogeno o un electrón a un radical libre y con esto inhibir la oxidación de sustratos oxidables de importancia biológica como lípidos, proteínas, carbohidratos y DNA. Es importante destacar que no son los compuestos fenólicos presentes en una matriz alimentaria los únicos que pueden ejercer actividad antioxidante, dependiendo de la naturaleza del alimento, pueden

estar involucrados en este mecanismo algunas vitaminas (Vitamina E y C), carotenos, incluso algunas proteínas y/o aminoácidos, lo cual en su conjunto es lo que se determina como actividad antioxidante en el alimento.

De lo anterior, es o surge el interés por evaluar la actividad antioxidante presente en digestos intestinales de galletas formuladas con harinas de masas de sorgo fermentadas. En la Tabla 7, se observan los resultados de la actividad antioxidante evaluada en las galletas antes y después del proceso de digestión para las galletas experimentales y control. Se destaca primeramente el incremento de la actividad antioxidante en los digestos de las galletas respecto a su actividad en las muestras antes de la digestión a excepción de GFLB_(48h).

La bioaccesibilidad de la actividad antioxidante presente en las galletas se determinó de la misma manera que la determinada para fenoles totales y ácido ferúlico, es decir que el valor de actividad antioxidante encontrado en las muestras de galletas antes de la digestión se consideró como el 100%. De tal manera que se observó que las galletas formuladas con masas sometidas a fermentación ácido-láctica presentaron valores de bioaccesibilidad superiores a 100% a excepción de GFLB_(48h) y también estos valores fueron superiores a la presentada por galletas control. En las galletas formuladas con masas fermentada con levadura, si bien los porcentajes de bioaccesibilidad todas superaron el 100%, ninguna logró superar a las galletas control (177%).

Un aspecto relevante fue que se observó una cierta asociación entre los valores de bioaccesibilidad de fenoles totales y actividad antioxidante, lo que viene a sugerir que la actividad antioxidante bioaccesible puede ser atribuida en parte a la presencia de los compuestos fenólicos presentes en los digestos.

Diversos estudios han demostrado que el aplicar algún tipo de procedimiento tecnológico a la matriz alimentaria, puede modificar el contenido de compuestos bioactivos como los fenoles, sin embargo una vez que la matriz alimentaria es sometida a proceso de digestión gastrointestinal, este contenido puede variar de manera significativa primero por las condiciones de la digestión (pH, enzimas) luego por las posibles interacciones entre los diferentes componentes de la matriz

alimentaria promoviéndose ya sea la pérdida o aumento de estos compuestos. (Dordević et al. 2010; Kariluoto et al. 2006; Katina, Liukkonen, et al. 2007).

Tabla 7. Bioaccesibilidad de actividad antioxidante en galletas formuladas de masas de sorgo sometidas a diferentes procesos fermentativos.

	Actividad Antioxidante $\mu\text{MET/g}$		B (%)
	Antes de la Digestión	Después de la Digestión	
Fracción metanólica			
GSC	2.39 ± 0.02^A	4.25 ± 0.48^{AB}	177
Fermentación Ácido-Láctica			
GFLB (36 h)	1.16 ± 0.09^B	5.38 ± 0.59^A	463
GFLB (20 h)	2.39 ± 0.03^A	4.77 ± 0.59^{AB}	199
GFLN (48 h)	1.53 ± 0.19^B	0.90 ± 0.07^C	58
GFLN (12 h)	0.84 ± 0.07^C	1.88 ± 0.22^C	223
Fermentación con Levadura			
GSC	2.39 ± 0.02^A	4.25 ± 0.48^A	177
GFLEV (30 min)	2.05 ± 0.21^B	3.25 ± 0.41^B	158
GFLEV (210 min)	2.39 ± 0.05^A	2.91 ± 0.09^B	121
GFLEVN (210 min)	1.04 ± 0.12^C	1.69 ± 0.09^C	162
GFLEVN (150 min)	1.52 ± 0.17^C	2.19 ± 0.27^B	144

Los valores corresponden a la media \pm error estándar (n=8). Medias con superíndices diferentes por columna y para cada tipo de fermentación son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). B (%): Porcentaje de bioaccesibilidad calculado como la actividad antioxidante medida en digesto intestinal de cada una de las galletas en relación a la actividad antioxidante medida en las galletas antes de la digestión tomado como el 100%.

Evaluación Sensorial de las Galletas Experimentales

De acuerdo con los resultados anteriores y asumiendo que compuestos bioactivos como los fenoles totales pueden contribuir de manera significativa a la actividad antioxidante fueron seleccionadas para la prueba de consumidores cuatro galletas, dos de cada grupo y en función del máximo valor de fenoles totales y actividad antioxidante presentes en las galletas antes de la digestión. De tal manera que los panelistas evaluaron las siguientes galletas: GFLB_(20 h), GFLN_(48 h), GFLEV_(210 min) y GFLEVN_(150 min), incluyendo además la galleta control (GSC).

Los resultados del efecto de la fermentación ácido-láctica en la aceptación sensorial (Figura 18), indicaron que ninguna de las galletas obtuvo la calificación máxima (7: me gusta mucho) en ninguno de los atributos evaluados. Este resultado se presenta de manera común en diversos estudios en donde se utilizan escalas hedónicas para la evaluación de atributos sensoriales (Chizoba, 2014; Nasir et al. 2010) en donde se ha observado que los panelistas pueden mostrar un cierto rechazo hacia los valores extremos. Se observa que las galletas con mayor aceptación en los atributos de color, olor y textura fueron las GSC y GFLN_(48 h) ($p > 0.05$). El atributo de sabor fue el que determinó la aceptabilidad general de estas galletas, ya que GFLN_(48 h) presentó menor calificación en sabor ($p < 0.05$) respecto a GSC reflejándose en una aceptabilidad general más baja.

Las GFLB_(20 h) fueron las que mostraron calificaciones más bajas de aceptabilidad general, afectada significativamente por el atributo de sabor, el cual recibió calificaciones menores a 4. Las muestras GFN_(48h) recibieron calificaciones similares a la GSC en los atributos de color, olor y textura ($p > 0.05$); sin embargo, nuevamente fue el sabor el atributo que recibió menor calificación, pero cercanos a valor de 5 (me gusta).

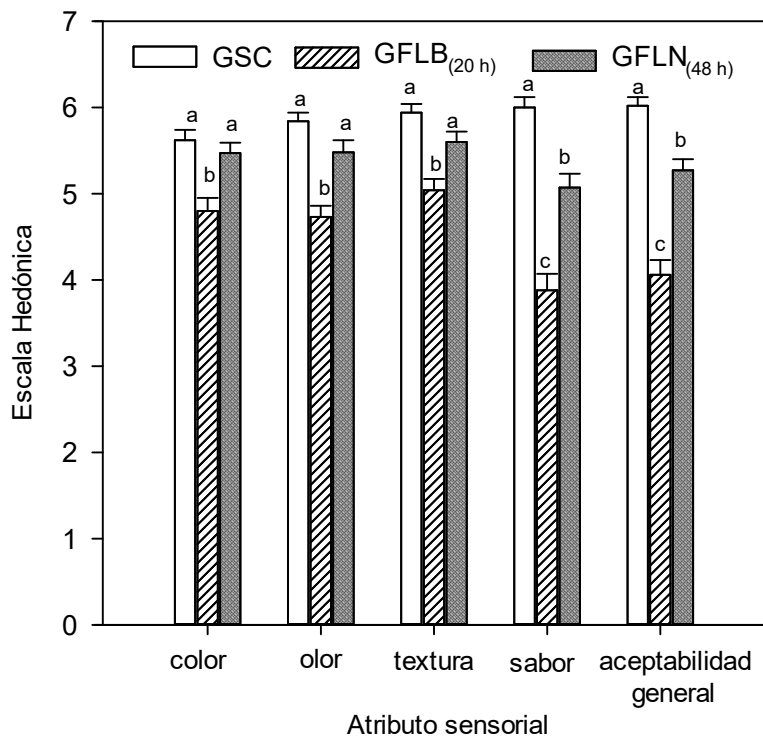


Figura 18. Prueba de aceptabilidad de atributos sensoriales en galletas formuladas a partir de masas de sorgo sometidas a fermentación ácido-láctica. Los valores corresponden al promedio de las calificaciones de 98 panelistas no entrenados. Subíndices diferentes sobre las barras para cada atributo sensorial son estadísticamente significativos ($p < 0.05$)

En la Figura 19 se observan las calificaciones otorgadas por los panelistas a las galletas formuladas con masas de sorgo fermentadas con y sin levadura añadida. Los panelistas otorgaron la mayor calificación a las GSC en todos los atributos a excepción del color que no mostró diferencia estadística entre las tres galletas evaluadas.

La prueba de intención de compra de parte de los panelistas demostró que la GSC obtuvo el mayor porcentaje de respuesta positiva a la compra (85%) mientras que la GFLB (20 h) fue la que obtuvo el menor porcentaje de intención de compra de parte de los panelistas (31%) (Figura 20). Estos resultados coinciden con el índice de aceptabilidad de las galletas (Tabla 8).

Resultados similares a los encontrados en este estudio fueron reportados por Chiremba, Taylor, & Duodu. (2009), quienes evaluaron la calidad sensorial de galletas elaboradas con distintos cultivares de sorgo y a distintas proporciones de extracción de harina, ellos encontraron una buena aceptación comparada con galleta de harina de trigo, no obstante es importante resaltar que en este estudio las harinas de sorgo utilizadas contenían un porcentaje muy bajo de salvado comparada con las harinas integrales utilizadas en nuestro estudio y que se reflejó en un incremento importante en el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante.

Por otra parte, en un estudio de evaluación sensorial de galletas formuladas con harinas de masas fermentadas con levadura fueron calificados los atributos de sabor, olor y textura no siendo del agrado de los panelistas, y que de acuerdo a sus comentarios, tenían un sabor y olor característico a una fermentación y también una palatabilidad no agradable por su textura granulosa Valenzuela-Gutiérrez (2017).

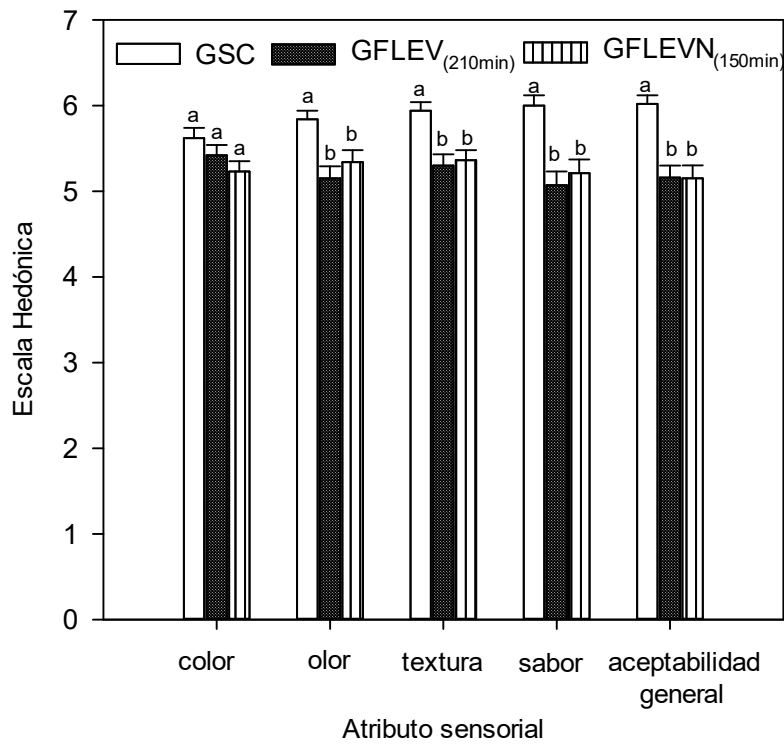


Figura 19. Prueba de aceptabilidad de atributos sensoriales en galletas formuladas a partir de masas de sorgo sometidas a fermentación alcohólica. Los valores corresponden al promedio de las calificaciones de 98 panelistas no entrenados. Subíndices diferentes sobre las barras para cada atributo sensorial son estadísticamente significativos ($p < 0.05$)

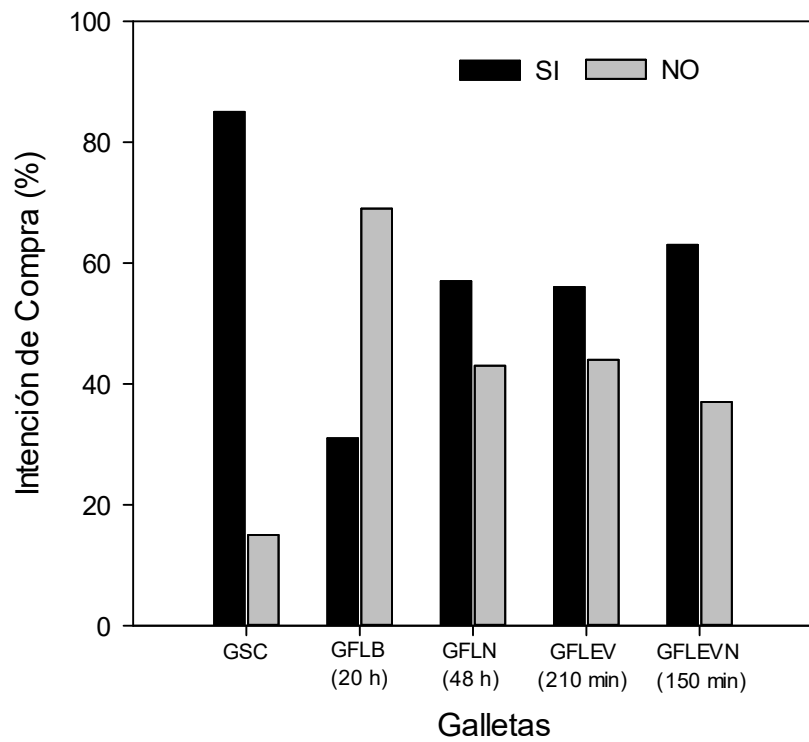


Figura 20. Prueba de intención de compra de galletas experimentales. SI: el consumidor aceptaría comprar la galleta; NO: el consumidor no aceptaría comprar la galleta.

Tabla 8. Índice de aceptabilidad de galletas formuladas a partir de masas fermentadas de sorgo¹

Galleta	Índice de Aceptabilidad (%)
GSC	86
GFLB (20 h)	58
GFLN (48 h)	75
GFLEV (210 min)	73
GFLEVN (150 min)	73

¹ El índice de aceptabilidad calculado a partir del promedio de la calificación obtenida para el atributo de aceptabilidad general de cada una de las galletas evaluadas x 100 y dividido entre la calificación más alta establecida por la escala hedónica.

CONCLUSIONES

Los procesos fermentativos incrementan de manera significativa el contenido de fenoles totales y ácido ferúlico comparado con las masas sin fermentar, correspondiendo los valores más altos a las masas tratadas por fermentación ácido-láctica (*backslopping*) y alcohólica (levadura añadida).

Comparado con las fermentaciones naturales (FLN y FLEVN), las fermentaciones con inóculo añadido (*backslopping* y levadura añadida) requieren de un menor tiempo de fermentación de las masas para obtener los valores más altos de fenoles totales, así como un mayor tiempo de fermentación para alcanzar el mayor contenido de ácido ferúlico.

Las galletas formuladas con harina de masas fermentadas por *backslopping* promueven una mayor bioaccesibilidad de fenoles totales comparadas con las galletas formuladas con masa fermentada por levadura.

La bioaccesibilidad del ácido ferúlico fue severamente afectada en todas las galletas dado que no se alcanzaron los porcentajes iniciales de este ácido fenólico antes de la digestión. No obstante, los tratamientos de las diferentes fermentaciones si pudieron aumentar la bioaccesibilidad de ácido ferúlico para todas las galletas experimentales ya que todos los valores siempre fueron más altos comparados con la galleta control.

La bioaccesibilidad de la actividad antioxidante de las galletas superó a la galleta control a excepción de las galletas GFLB_(48h).

En lo que respecta a los atributos sensoriales de las galletas formuladas con las distintas masas fermentadas, ninguna de las galletas experimentales logró superar la aceptabilidad general alcanzada por la galleta control; sin embargo, a excepción de GFLN_(48h) todas las galletas lograron superar la mínima calificación de aceptación general, coincidiendo con la intención de compra e índice de aceptabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- AACC. (1999). Measurement of Bread Firmness by Universal Testing Machine, Method: 74-09. *AACC International Approved Methods*, 7–10.
- Abdel-rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 31(6), 877–902. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002>
- Acosta-estrada, B. A., Gutiérrez-uribe, J. A., & Serna-saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods , a review. *FOOD CHEMISTRY*, 152, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>
- Adebiyi, J. A., Njobeh, P. B., & Kayitesi, E. (2019). Assessment of nutritional and phytochemical quality of Dawadawa (an African fermented condiment) produced from Bambara groundnut (*Vigna subterranea*). *Microchemical Journal*, 149(May), 104034. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104034>
- Adebo, O. A. (2020, April 1). African sorghum-based fermented foods: Past, current and future prospects. *Nutrients*, Vol. 12. <https://doi.org/10.3390/nu12041111>
- Adebo, O. A., Njobeh, P. B., & Kayitesi, E. (2018). Fermentation by *Lactobacillus fermentum* strains (singly and in combination) enhances the properties of ting from two whole grain sorghum types. *Journal of Cereal Science*, 82, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.05.008>
- Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6182–6187. <https://doi.org/10.1021/jf0205099>
- Afify, A. E., El-beltagi, H. S., El-salam, S. M. A., & Omran, A. A. (2012). Biochemical changes in phenols , flavonoids , tannins , vitamin E , ̢-carotene and antioxidant activity during soaking of three white sorghum varieties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), 203–209. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60042-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60042-2)
- Aguilar-Hernández, I., Afseth, N. K., López-Luke, T., Contreras-Torres, F. F., Wold, J. P., & Ornelas-Soto, N. (2017). Surface enhanced Raman spectroscopy of phenolic antioxidants: A systematic evaluation of ferulic acid, p-coumaric acid, caffeic acid and sinapic acid. *Vibrational Spectroscopy*, 89, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2017.02.002>
- Akillioglu, H. G., & Karakaya, S. (2010). *Changes in Total Phenols , Total Flavonoids , and Antioxidant Activities of Common Beans and Pinto Beans after Soaking , Cooking , and Digestion Process*. 19(3), 633–639. <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0089-8>
- Alam, M. A. (2019). Anti-hypertensive Effect of Cereal Antioxidant Ferulic Acid and Its Mechanism of Action. *Frontiers in Nutrition*, 6(August), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00121>
- Aleman, R. (2016). *Ciencias de la Vida Evaluación in vitro de prebióticos en hidrolizados de levadura (Saccharomyces In vitro evaluation of prebiotics in hydrolysates of yeast*. (May).
- Andreasen, M. F., Christensen, L. P., Meyer, A. S., & Hansen, Å. (1999). Release of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in rye by commercial plant cell wall degrading enzyme preparations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,

- 79(3), 411–413. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990301\)79:3<411::AID-JSFA264>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3<411::AID-JSFA264>3.0.CO;2-X)
- Anson, N. M., Havenaar, R., Vaes, W., Coulier, L., Venema, K., Selinheimo, E., ... Haenen, G. R. M. M. (2011). Effect of bioprocessing of wheat bran in wholemeal wheat breads on the colonic SCFA production in vitro and postprandial plasma concentrations in men. *Food Chemistry*, *128*(2), 404–409. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.043>
- Anson, N. M., Selinheimo, E., Havenaar, R., Aura, A. M., Mattila, I., Lehtinen, P., ... Haenen, G. R. M. M. (2009). Bioprocessing of wheat bran improves in vitro bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(14), 6148–6155. <https://doi.org/10.1021/jf900492h>
- Awika, J. M., Rooney, L. W., Wu, X., Prior, R. L., & Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening Methods to Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(23), 6657–6662. <https://doi.org/10.1021/jf034790i>
- Belobrajdic, D. P., Frystyk, J., Jeyaratnaganathan, N., Espelund, U., Flyvbjerg, A., Clifton, P. M., & Noakes, M. (2010). Moderate energy restriction-induced weight loss affects circulating IGF levels independent of dietary composition. *European Journal of Endocrinology*, *162*(6), 1075–1082. <https://doi.org/10.1530/EJE-10-0062>
- Bhanja Dey, T., & Kuhad, R. C. (2014). Upgrading the antioxidant potential of cereals by their fungal fermentation under solid-state cultivation conditions. *Letters in Applied Microbiology*, *59*(5), 493–499. <https://doi.org/10.1111/lam.12300>
- Blancas-Benitez, F. J., Mercado-Mercado, G., Quirós-Sauceda, A. E., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G. A., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2015). Bioaccessibility of polyphenols associated with dietary fiber and in vitro kinetics release of polyphenols in Mexican “Ataulfo” mango (*Mangifera indica* L.) by-products. *Food and Function*, *6*(3), 859–868. <https://doi.org/10.1039/c4fo00982g>
- Boskov Hansen, H., Andreasen, M. F., Nielsen, M. M., Larsen, L. M., Bach Knudsen, K. E., Meyer, A. S., ... Hansen, A. (2002). Changes in dietary fibre, phenolic acids and activity of endogenous enzymes during rye bread-making. *European Food Research and Technology*, *214*(1), 33–42. <https://doi.org/10.1007/s00217-001-0417-6>
- Călinoiu, L. F., Cătoi, A. F., & Vodnar, D. C. (2019). Solid-state yeast fermented wheat and oat bran as a route for delivery of antioxidants. *Antioxidants*, *8*(9). <https://doi.org/10.3390/antiox8090372>
- Cardoso, L. de M., Pinheiro, S. S., de Carvalho, C. W. P., Queiroz, V. A. V., de Menezes, C. B., Moreira, A. V. B., ... Pinheiro-Sant’Ana, H. M. (2015). Phenolic compounds profile in sorghum processed by extrusion cooking and dry heat in a conventional oven. *Journal of Cereal Science*, *65*, 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.06.015>
- Chandrasekara, A., & Shahidi, F. (2010). Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(11), 6706–6714. <https://doi.org/10.1021/jf100868b>
- Chhikara, N., Abdulahi, B., Munezero, C., Kaur, R., Singh, G., & Panghal, A. (2019),

- March 11). Exploring the nutritional and phytochemical potential of sorghum in food processing for food security. *Nutrition and Food Science*, Vol. 49, pp. 318–332. <https://doi.org/10.1108/NFS-05-2018-0149>
- Chirembe, C., Rooney, L. W., & Beta, T. (2012). *Microwave-Assisted Extraction of Bound Phenolic Acids in Bran and Flour Fractions from Sorghum and Maize Cultivars Varying in Hardness*. <https://doi.org/10.1021/jf300279t>
- Chirembe, C., Taylor, J. R. N., & Duodu, K. G. (2009). Phenolic content, antioxidant activity, and consumer acceptability of sorghum cookies. *Cereal Chemistry*, 86(5), 590–594. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-86-5-0590>
- Chirembe, C., Taylor, J. R. N., Rooney, L. W., & Beta, T. (2012). Phenolic acid content of sorghum and maize cultivars varying in hardness. *Food Chemistry*, 134(1), 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.067>
- Chizoba, N. (2014). *Sensory evaluation of cookies produced from different blends of wheat and Moringa oleifera leaf flour*. 3(4), 307–310. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20140304.21>
- Coda, R., Giuseppe, C., Antonio, J., Poutanen, K., & Katina, K. (2014). Effect of bioprocessing and particle size on the nutritional properties of wheat bran fractions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, (2013). <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.11.012>
- Coulibaly, W. H. . 2 C. M. . 1*N'guessan, K. F. . 3Coulibaly, I. . 4 R. P. and 1 D. K. M. (2018). Ethanol effect on yeast strains isolated from tchapalo, a traditional sorghumbeer from Côte d'Ivoire. *International Food Research Journal*, 2, 612–619.
- De Munter, J. S. L., Hu, F. B., Spiegelman, D., Franz, M., & Van Dam, R. M. (2007). Whole Grain, Bran, and Germ Intake and Risk of Type 2 Diabetes: A Prospective Cohort Study and Systematic Review. *PLoS Medicine | Wwww*, 4, 1385. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed>
- Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J. A., & Morales, F. J. (2005). Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7832–7836. <https://doi.org/10.1021/jf0512353>
- Dewanto, V., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4959–4964. <https://doi.org/10.1021/jf0255937>
- Djameh, C., Ellis, W. O., Oduro, I., Saalia, F. K., Haslbeck, K., & Komlaga, G. A. (2019). West African sorghum beer fermented with *Lactobacillus delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae*: fermentation by-products. *Journal of the Institute of Brewing*, 125(3), 326–332. <https://doi.org/10.1002/jib.562>
- Dlamini, N. R., Taylor, J. R. N., & Rooney, L. W. (2007). *Food Chemistry The effect of sorghum type and processing on the antioxidant properties of African sorghum-based foods*. 105, 1412–1419. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.017>
- Dordević, T. M., Šiler-Marinković, S. S., & Dimitrijević-Branković, S. I. (2010). Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry*, 119(3), 957–963. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.049>
- Dornez, E., Gebruers, K., Wiame, S., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2006). Insight into the distribution of arabinoxylans, endoxylanases, and endoxylanase

- inhibitors in industrial wheat roller mill streams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8521–8529. <https://doi.org/10.1021/jf061728n>
- Dykes, L., & Rooney, L. W. (2007). Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Foods World*, 52(3), 105–111. <https://doi.org/10.1094/CFW-52-3-0105>
- Dykes, Linda. (2019). Tannin analysis in sorghum grains. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1931, pp. 109–120). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9039-9_8
- Elkhalifa, A. E. O., Schiffler, B., & Bernhardt, R. (2004). Selected physicochemical properties of starch isolated from fermented sorghum flour. *Starch/Staerke*, 56(12), 582–585. <https://doi.org/10.1002/star.200400309>
- Elkhalifa, A. E. O., Schiffler, B., & Bernhardt, R. (2005). Effect of fermentation on the functional properties of sorghum flour. *Food Chemistry*, 92(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.05.058>
- Elvaux, F. R. R. D. (2004). *Ferulic Acid Release and 4-Vinylguaiacol Formation during Brewing and Fermentation : Indications for Feruloyl Esterase Activity in Saccharomyces cerevisiae*. 602–608.
- Falasconi, I., Fontana, A., Patrone, V., Rebecchi, A., & Morelli, L. (2020). *Genome-Assisted Characterization of Lactobacillus fermentum , Weissella cibaria , and Weissella confusa Strains Isolated from Sorghum as Starters for Sourdough Fermentation*. 1–16.
- Fardet, A. (2010). New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: What is beyond fibre? *Nutrition Research Reviews*, 23(1), 65–134. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000041>
- Fardet, A., Rock, E., & Révész, C. (2008). Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? *Journal of Cereal Science*, 48(2), 258–276. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.01.002>
- Faulds, C. B., & Williamson, G. (1995). *Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE-III) from Aspergillus niger*. 1082–1087.
- Gabaza, M., Joossens, M., Cnockaert, M., Muchuweti, M., Raes, K., & Vandamme, P. (2019). Lactococci dominate the bacterial communities of fermented maize, sorghum and millet slurries in Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology*, 289(January 2018), 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.001>
- Garzón, A. G., Torres, R. L., & Drago, S. R. (2019). Changes in phenolics, γ -aminobutyric acid content and antioxidant, antihypertensive and hypoglycaemic properties during ale white sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) brewing process. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(5), 1901–1908. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14102>
- Girard, A. L., & Awika, J. M. (2018). Sorghum polyphenols and other bioactive components as functional and health promoting food ingredients. *Journal of Cereal Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.10.009>
- Gobbetti, M., Rizzello, C. G., Cagno, R. Di, & Angelis, M. De. (2013). How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.012>
- Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W. S., Courtin, C. M., Gebruers, K., & Delcour, J. A. (2005). *Wheat flour constituents : how they impact bread quality , and how*

- to impact their functionality. 16, 12–30. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.011>
- GRAF, E. (1992). ANTIOXIDANT POTENTIAL OF FERULIC ACID ERNST. 13, 435–448.
- Gutiérrez-Grijalva, E. P., Ambriz-Pérez, D. L., Leyva-López, N., Castillo-López, R. I., & Heredia, J. B. (2016). Review: Dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 66(2), 87–100.
- Hemery, Y., Chaurand, M., Holopainen, U., Lampi, A. M., Lehtinen, P., Piironen, V., ... Rouau, X. (2011). Potential of dry fractionation of wheat bran for the development of food ingredients, part I: Influence of ultra-fine grinding. *Journal of Cereal Science*, 53(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.09.005>
- Hithamani, G., & Srinivasan, K. (2014). Effect of domestic processing on the polyphenol content and bioaccessibility in finger millet (*Eleusine coracana*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *Food Chemistry*, 164, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.107>
- Hole, A. S., Rud, I., Grimmer, S., Sigl, S., Narvhus, J., & Sahlstrøm, S. (2012). Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(25), 6369–6375. <https://doi.org/10.1021/jf300410h>
- Holzappel, W. H. (2005). Introduction to prebiotics and probiotics. *Probiotics in Food Safety and Human Health*, 35, 1–33. <https://doi.org/10.1201/9781420027570.ch1>
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 SUPPL.). <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.365s>
- Hsu, C. L., & Yen, G. C. (2008). Phenolic compounds: Evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(1), 53–61. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700393>
- Hwang, K. T., Cuppett, S. L., Weller, C. L., & Hanna, M. A. (2002). Properties, composition, and analysis of grain sorghum wax. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(6), 521–527. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0515-5>
- Ilo, S., & Berghofer, E. (1999). Kinetics of colour changes during extrusion cooking of maize grits. 39.
- Isabel Bondia-Pons a, Anna-Marja Aura b, Satu Vuorela b, Marjukka Kolehmainen a, Hannu Mykkaänen a, K. P. a. (2009). Rye phenolics in nutrition and health. 49, 323–336. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.01.007>
- Jafari, M., Koocheki, A., & Milani, E. (2018). Physicochemical and sensory properties of extruded sorghum–wheat composite bread. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 370–377. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9649-4>
- Jay, J. M. (2000). Indicators of Food Microbial Quality and Safety. *Modern Food Microbiology*, 387–406. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4427-2_20
- Jha, N., Krishnan, R., & Meera, M. S. (2015). Effect of different soaking conditions on inhibitory factors and bioaccessibility of iron and zinc in pearl millet. *Journal of Cereal Science*, 66, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.10.002>

- Justo, M. L., Claro, C., Zeyda, M., Stulnig, T. M., Herrera, M. D., & Rodríguez-Rodríguez, R. (2016). Rice bran prevents high-fat diet-induced inflammation and macrophage content in adipose tissue. *European Journal of Nutrition*, *55*(6), 2011–2019. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-1015-x>
- Kanakaraju, Y., Uma, A., Vani, G., Kiran Kumari, P., Sridhar, S., & Umakanth, A. V. (2020). Evaluation of ethanol fermentation efficiency of sweet sorghum syrups produced by integrated dual-membrane system. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, (0123456789). <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02313-9>
- Kariluoto, S., Aittamaa, M., Korhola, M., Salovaara, H., Vahteristo, L., & Piironen, V. (2006). Effects of yeasts and bacteria on the levels of folates in rye sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*, *106*(2), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.013>
- Katina, K., Arendt, E., Liukkonen, K., & Autio, K. (2005). *Potential of sourdough for healthier cereal products*. *16*, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.03.008>
- Katina, K., Laitila, A., Juvonen, R., Liukkonen, K., Kariluoto, S., & Piironen, V. (2007). *ARTICLE IN PRESS FOOD Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye*. *24*, 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.012>
- Katina, K., Liukkonen, K. H., Kaukovirta-Norja, A., Adlercreutz, H., Heinonen, S. M., Lampi, A. M., ... Poutanen, K. (2007). Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *Journal of Cereal Science*, *46*(3), 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.07.006>
- Kaukovirta-norja, A., Wilhelmson, A., & Poutanen, K. (2004). *Germination : a means to improve the functionality of oat*. *13*(June 2003), 100–112.
- Kim, D. H., Jeong, D., Song, K. Y., & Seo, K. H. (2018). Comparison of traditional and backslipping methods for kefir fermentation based on physicochemical and microbiological characteristics. *Lwt*, *97*, 503–507. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.023>
- Kirsi-Helena Liukkonen, Kati Katina, Annika Wilhelmsson, Olavi Myllymaki, A.-M. L. (2003). Session: Health effects of whole grains Process-indices changes on bioactive compounds in whole grain rye. *Poceedings of the Nutrition Society*, *7*(62), 117–122.
- Koistinen, V. M., Mattila, O., Katina, K., Poutanen, K., Aura, A. M., & Hanhineva, K. (2018). Metabolic profiling of sourdough fermented wheat and rye bread. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24149-w>
- KONFO, C. T. R., CHABI, N. W., DAHOUENON-AHOUSI, E., CAKPO-CHICHI, M., SOUMANOU, M. M., & SOHOUNHLOUE, D. C. K. (2015). Improvement of african traditional sorghum beers quality and potential applications of plants extracts for their stabilization: A review. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *05*(02), 190–196. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.5.2.190-196>
- Liu, R. H. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, *46*(3), 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.06.010>
- Liyana-Pathirana, C. M., & Shahidi, F. (2006). Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(4), 1256–1264. <https://doi.org/10.1021/jf052556h>

- Mallasy, L. O., El Tinay, A. H., Elkhalifa, A. E. O., Ali, M. A. M., Mohiedeen, I. E., & Yousif, N. E. (2010). Effect of fermentation on biochemical and sensory characteristics of millet flour supplemented with whey protein. *International Journal of Food Science and Technology*, *45*(11), 2387–2393. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02412.x>
- Mancuso, C., & Santangelo, R. (2014). Ferulic acid : Pharmacological and toxicological aspects. *FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY*, *65*, 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.024>
- Mateo Anson, N., van den Berg, R., Havenaar, R., Bast, A., & Haenen, G. R. M. M. (2009). Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility. *Journal of Cereal Science*, *49*(2), 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.12.001>
- Michalska, A., Amigo-Benavent, M., Zielinski, H., & del Castillo, M. D. (2008). Effect of bread making on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread. *Journal of Cereal Science*, *48*(1), 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.08.012>
- Mohammed, S. I., Steenson, L. R., & Kirleis, A. W. (1991). Isolation and characterization of microorganisms associated with the traditional sorghum fermentation for production of Sudanese Kisra. *Applied and Environmental Microbiology*, *57*(9), 2529–2533. <https://doi.org/10.1128/aem.57.9.2529-2533.1991>
- Mohapatra, D., Patel, A. S., Kar, A., Deshpande, S. S., & Tripathi, M. K. (2019). Effect of different processing conditions on proximate composition, anti-oxidants, anti-nutrients and amino acid profile of grain sorghum. *Food Chemistry*, *271*, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.196>
- Morales-Ortega, A., Niño-Medina, G., Carvajal-Millán, E., Gardea-Béjar, A., Torres-Chávez, P., López-Franco, Y., ... Lizardi-Mendoza, J. (2013). Revista fitotecnia mexicana publicada por la Sociedad Mexicana de Fitogenética. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *36*(4), 439–446. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000400010
- Moslehi-Jenabian, S., Pedersen, L. L., & Jespersen, L. (2010). Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients*, *2*(4), 449–473. <https://doi.org/10.3390/nu2040449>
- N'Dri, D., Mazzeo, T., Zaupa, M., Ferracane, R., Fogliano, V., & Pellegrini, N. (2013). Effect of cooking on the total antioxidant capacity and phenolic profile of some whole-meal African cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(1), 29–36. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5837>
- Naowaboot, J., Piyabhan, P., Munkong, N., Parklak, W., & Pannangpetch, P. (2016). Ferulic acid improves lipid and glucose homeostasis in high-fat diet-induced obese mice. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *43*(2), 242–250. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12514>
- Nasir, M., Siddiq, M., Ravi, R., Harte, J. B., Dolan, K. D., & Butt, M. S. (2010). Physical quality characteristics and sensory evaluation of cookies made with added defatted maize germ flour. *Journal of Food Quality*, *33*(1), 72–84. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2009.00291.x>
- Ni, K., Wang, Y., Cai, Y., & Pang, H. (2015). Natural lactic acid bacteria population

- and silage fermentation of whole-crop wheat. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(8), 1123–1132. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0955>
- Nomusa Rhoda, Ngw. (2007). The effect of sorghum type and processing on the antioxidant properties of sorghum (*Sorghum bicolor* (L). Moench) based foods. *Food Chemistry*, 105(May), 1412–1419.
- Omoba, Olufunmilayo S., Taylor, J. R. N., & de Kock, H. L. (2015). Sensory and nutritive profiles of biscuits from whole grain sorghum and pearl millet plus soya flour with and without sourdough fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(12), 2554–2561. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12923>
- Omoba, Olufunmilayo Sade, & Isah, L. R. (2018). Influence of sourdough fermentation on amino acids composition, phenolic profile, and antioxidant properties of sorghum biscuits. *Preventive Nutrition and Food Science*, 23(3), 220–227. <https://doi.org/10.3746/pnf.2018.23.3.220>
- Ornez, E. M. D., Ebruers, K. U. R. T. G., Iame, S. T. W., Elcour, J. A. N. A. D., & Ourtin, C. H. M. C. (2006). *Insight into the Distribution of Arabinoxylans, Endoxylanases, and Endoxylanase Inhibitors in Industrial Wheat Roller Mill Streams*. <https://doi.org/10.1021/jf061728n>
- Parada, J., & Aguilera, J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00274.x>
- Pekkinen, J., Rosa, N. N., Savolainen, O., Keski-rahkonen, P., Mykkänen, H., Poutanen, K., ... Hanhineva, K. (2014). *Disintegration of wheat aleurone structure has an impact on the bioavailability of phenolic compounds and other phytochemicals as evidenced by altered urinary metabolite profile of diet-induced obese mice*.
- Peñarrieta, J. M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). *PHENOLIC COMPOUNDS IN FOOD* ‡.
- Perdon, A. A., & Holopainen-Mantila, U. (2020). Cereal grains and other ingredients. In *Breakfast Cereals and How They Are Made* (pp. 73–96). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812043-9.00004-7>
- Pérez, M., Piad, R., Milian, G., Felipe, M. das G., Ferreira, A., de Mancilha, I. M., ... de Almeida e Silva, J. B. (2007). Preparation of a crude enzymatic from *Bacillus licheniformes* E-44 and its evaluation in the hydrolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(3), 452–455. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.020>
- Poutanen, K., Flander, L., & Katina, K. (2009). Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology*, 26(7), 693–699. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.011>
- Querol, A., Fernández-Espinar, M. T., Del Olmo, M., & Barrio, E. (2003). Adaptive evolution of wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 3–10. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00244-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00244-7)
- Rashad, M. M., Mahmoud, A. E., Abdou, H. M., & Nooman, M. U. (2011). Improvement of nutritional quality and antioxidant activities of yeast fermented soybean curd residue. *African Journal of Biotechnology*, 10(28), 5504–5513. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1658>
- Reicks, M., Jonnalagadda, S., Albertson, A. M., & Joshi, N. (2014). Total dietary fiber

- intakes in the US population are related to whole grain consumption: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2009 to 2010. *Nutrition Research*, 34(3), 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2014.01.002>
- Ribas-Agustí, A., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., & Elez-Martínez, P. (2018). Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(15), 2531–2548. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1331200>
- Ripari, V., Bai, Y., & Gänzle, M. G. (2019). Metabolism of phenolic acids in whole wheat and rye malt sourdoughs. *Food Microbiology*, 77(July 2018), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.08.009>
- Robin, F., Théoduloz, C., & Srichuwong, S. (2015). Properties of extruded whole grain cereals and pseudocereals flours. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(10), 2152–2159. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12893>
- Rose, D. J., & Inglett, G. E. (2010). Production of feruloylated arabinoxylo-oligosaccharides from maize (*Zea mays*) bran by microwave-assisted autohydrolysis. *Food Chemistry*, 119(4), 1613–1618. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.053>
- Salazar-López, N. J., Loarca-piña, G., Campos-vega, R., Martínez, M. G., Sánchez, E. M., Esquerra-brauer, J. M., ... Sánchez, M. R. (2016). The Extrusion Process as an Alternative for Improving the Biological Potential of Sorghum Bran: Phenolic Compounds and Antiradical and Anti-Inflammatory Capacity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.
- Salazar-lópez, N. J., González-aguilar, G., Rouzaud-sández, O., & Robles-sánchez, M. (2018). *Technologies applied to sorghum (Sorghum bicolor L . Moench) : changes in phenolic compounds and antioxidant capacity*. 2061(3), 369–382.
- Salazar-López, N.J., González-Aguilar, G. A., Loarca-Piña, G., Cinco-Moroyoqui, F. J., Rouzaud-Sández, O., Domínguez-Avila, J. A., & Robles-Sánchez, M. (2017). Contribution and Interactions of Hydroxycinnamic Acids Found in Bran and Wholegrain Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench): Effects on the Antioxidant Capacity and Inhibition of Human Erythrocyte Hemolysis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8219023>
- Salazar-Lopez Norma Julieta, Humberto Astiazarán-García , Gustavo A. González-Aguilar, Guadalupe Loarca-Piña 3, Josafat-Marina Ezquerra-Brauer 1, J. A. D. A. and M. R.-S. (2017). *Ferulic Acid on Glucose Dysregulation, Dyslipidemia, and Inflammation in Diet-Induced Obese Rats: An Integrated Study*. (II), 1–13. <https://doi.org/10.3390/nu9070675>
- Salazar-López, Norma Julieta, González-Aguilar, G. A., Rouzaud-Sández, O., & Robles-Sánchez, M. (2018). Bioaccessibility of hydroxycinnamic acids and antioxidant capacity from sorghum bran thermally processed during simulated in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Food Science and Technology*, 55(6), 2021–2030. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3116-z>
- Sancho, A. I., Williamson, G., Faulds, C. B., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2001). Release of ferulic acid from cereal residues by barley enzymatic extracts. *Journal of Cereal Science*, 34(2), 173–179. <https://doi.org/10.1006/jcrs.2001.0386>
- Schober, T. J., Bean, S. R., & Boyle, D. L. (2007). Gluten-free sorghum bread

- improved by sourdough fermentation: Biochemical, rheological, and microstructural background. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5137–5146. <https://doi.org/10.1021/jf0704155>
- Sekwati-Monang, B., & Gänzle, M. G. (2011). Microbiological and chemical characterisation of ting, a sorghum-based sourdough product from Botswana. *International Journal of Food Microbiology*, 150(2–3), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.021>
- Sekwati-Monang, B., Valcheva, R., & Gänzle, M. G. (2012). Microbial ecology of sorghum sourdoughs: Effect of substrate supply and phenolic compounds on composition of fermentation microbiota. *International Journal of Food Microbiology*, 159(3), 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.013>
- Seo, C., Yi, B., Oh, S., Kwon, S., Kim, S., Song, N., ... Won, K. (2015). Aqueous extracts of hulled barley containing coumaric acid and ferulic acid inhibit adipogenesis in vitro and obesity in vivo. *Journal of Functional Foods*, 12, 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.11.022>
- Shahidi, F., & Peng, H. (2018). Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Journal of Food Bioactives*, 4, 11–68. <https://doi.org/10.31665/jfb.2018.4162>
- Shiferaw Terefe, N., & Augustin, M. A. (2019). Fermentation for tailoring the technological and health related functionality of food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–27. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1666250>
- Shrivastava, N., & Ananthanarayan, L. (2014). *Use of the backslopping method for accelerated and nutritionally enriched idli fermentation*. (September). <https://doi.org/10.1002/jsfa.6923>
- Shumoy, H., Gabaza, M., Vandeveld, J., & Raes, K. (2017). Soluble and bound phenolic contents and antioxidant capacity of tef injera as affected by traditional fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 58, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.004>
- Silván, J. M., Assar, S. H., Srey, C., Dolores Del Castillo, M., & Ames, J. M. (2011). Control of the Maillard reaction by ferulic acid. *Food Chemistry*, 128(1), 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.047>
- Singh, K., & Sneh, S. (2017). Enhancement of bioactive compounds in barley cultivars by solid substrate fermentation. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(3), 1355–1361. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9513-6>
- Skrajda-Brdak, M., Konopka, I., Tańska, M., & Czaplicki, S. (2019). Changes in the content of free phenolic acids and antioxidative capacity of wholemeal bread in relation to cereal species and fermentation type. *European Food Research and Technology*, 245(10), 2247–2256. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03331-y>
- Slavin, J. (2003). Why whole grains are protective: biological mechanisms. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 129–134. <https://doi.org/10.1079/pns2002221>
- Srinivasan, M., Sudheer, A. R., & Menon, V. P. (2007). *Recent Advances in Indian Herbal Drug Research Guest Editor : Thomas Paul Asir Devasagayam Ferulic Acid : Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property*. (March), 92–100.
- Stratil, P., Klejdus, B., & Kubáň, V. (2007). Determination of phenolic compounds and

- their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*, 71(4), 1741–1751.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.08.012>
- Suhendro, E. L., Kunetz, C. F., Mcdonough, C. M., Rooney, L. W., & Waniska, R. D. (2000). *Cooking Characteristics and Quality of Noodles from Food Sorghum*. (C), 96–100. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2000.77.2.96>
- Svensson, L., Sekwati-Monang, B., Lutz, D. L., Schieber, R., & Gänzle, M. G. (2010). Phenolic acids and flavonoids in nonfermented and fermented red sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 9214–9220. <https://doi.org/10.1021/jf101504v>
- Taylor, J. R., & Duodu, K. G. (2015). Effects of processing sorghum and millets on their phenolic phytochemicals and the implications of this to the health-enhancing properties of sorghum and millet food and beverage products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(2), 225–237.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.6713>
- Thiele, C., Grassl, S., & Gänzle, M. (2004). Gluten Hydrolysis and Depolymerization during Sourdough Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1307–1314. <https://doi.org/10.1021/jf034470z>
- Ti, H., Zhang, R., Li, Q., Wei, Z., & Zhang, M. (2015). Effects of cooking and in vitro digestion of rice on phenolic profiles and antioxidant activity. *FRIN*, 76, 813–820. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.032>
- Traka, M. H., & Mithen, R. F. (2011). Plant science and human nutrition: Challenges in assessing health-promoting properties of phytochemicals. *Plant Cell*, 23(7), 2483–2497. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087916>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Valenzuela Gutierrez, J. L. (2017). *Evaluación de la Calidad Sensorial y Actividad Biológica de Galletas Formuladas a partir de Harina Integral de Sorgo (Sorghum bicolor. L. Moench) Sometida a Proceso de Fermentación*. UNIVERSIDAD DE SONORA.
- Villalva, M. F. A., González-Aguilar, G., Sáñez, O. R., García, H. A., Osuna, A. I. L., López-Ahumada, G. A., & Robles-Sánchez, R. M. (2018). Bioprocessing of wheat (*Triticum aestivum* cv. kronstad) bran from northwest Mexico: Effects on ferulic acid bioaccessibility in breads. *CYTA - Journal of Food*, 16(1), 570–579. <https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1440007>
- Vitaglione, P., Napolitano, A., & Fogliano, V. (2008, September). Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 19, pp. 451–463.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.02.005>
- Vrancken, G., Rimaux, T., Weckx, S., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2011a). Influence of temperature and backslopping time on the microbiota of a type I propagated laboratory wheat sourdough fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(8), 2716–2726. <https://doi.org/10.1128/AEM.02470-10>
- Vrancken, G., Rimaux, T., Weckx, S., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2011b). Influence of temperature and backslopping time on the microbiota of a type I propagated laboratory wheat sourdough fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(8), 2716–2726. <https://doi.org/10.1128/AEM.02470-10>

- Wee, Y. J., Kim, J. N., & Ryu, H. W. (2006). Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 163–172.
- Wessels, S., Axelsson, L., Bech Hansen, E., De Vuyst, L., Laulund, S., Lähteenmäki, L., ... Von Wright, A. (2004). The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in Food Science and Technology*, 15(10), 498–505.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.03.003>
- Wong, D. w. s. (2006). *Feruloyl Esterase*. 133, 87–112.
- Wu, G., Johnson, S. K., Bornman, J. F., Bennett, S. J., & Fang, Z. (2017). Changes in whole grain polyphenols and antioxidant activity of six sorghum genotypes under different irrigation treatments. *Food Chemistry*, 214, 199–207.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.089>
- Wu, L., Huang, Z., Qin, P., & Ren, G. (2013). Effects of processing on phytochemical profiles and biological activities for production of sorghum tea. *Food Research International*, 53(2), 678–685. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.062>
- Xiong, Y., Zhang, P., Warner, R. D., & Fang, Z. (2019). *Sorghum Grain : From Genotype , Nutrition , and Phenolic Profile to Its Health Benefits and Food Applications*. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12506>
- Yousif, N. E., & El Tinay, A. H. (2001). Effect of fermentation on sorghum protein fractions and in vitro protein digestibility. In *Plant Foods for Human Nutrition* (Vol. 56).
- Zaroug, M., Orhan, I. E., Senol, F. S., & Yagi, S. (2014). Comparative antioxidant activity appraisal of traditional Sudanese kisra prepared from two sorghum cultivars. *Food Chemistry*, 156, 110–116.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.069>
- Zhang, C., Wen, H., Chen, C., Cai, D., Fu, C., Li, P., ... Tan, T. (2019). Simultaneous saccharification and juice co-fermentation for high-titer ethanol production using sweet sorghum stalk. *Renewable Energy*, 134, 44–53.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.11.005>
- Zheng, X., Wang, J., Liu, X., Sun, Y., Zheng, Y., Wang, X., & Liu, Y. (2015). Effect of hydrolysis time on the physicochemical and functional properties of corn glutelin by Protamex hydrolysis. *Food Chemistry*, 172, 407–415.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.080>
- Zhu, Y., Shi, Z., Yao, Y., Hao, Y., & Ren, G. (2017). Antioxidant and anti-cancer activities of proanthocyanidins-rich extracts from three varieties of sorghum (*Sorghum bicolor*) bran. *Food and Agricultural Immunology*, 28(6), 1530–1543.
<https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1351526>
- Zielinski, H. (2001). *Bioactive compounds in the cereal grains before and after hydrothermal processing*.