

Selección de cepas de *Rhizopus oligosporus* para la producción local de tempeh elaborado con una mezcla de garbanzo, quinoa y semillas de girasol como fuente de proteína de alta calidad

Romina Boccagni Quesada

Tesis de Maestría

Presentada como uno de los requisitos para el título de:
Magister en Ciencias Nutricionales

Programa de Maestría en Ciencias Nutricionales de la Facultad de Ciencias
Universidad de la República

19 de diciembre 2024

Selección de cepas de *Rhizopus oligosporus* para la producción local de tempeh elaborado con una mezcla de garbanzo, quinoa y semillas de girasol como fuente de proteína de alta calidad

Romina Boccagni Quesada

Programa de Maestría en Ciencias Nutricionales de la Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Directora de tesis

Dra. Caterina Rufo

Laboratorio de Alimentos y Nutrición, Instituto Polo Tecnológico de Pando

Facultad de Química - Universidad de la República

Tribunal:

Dra. Claudia Lareo

Dra. Marcela Guerendiain

Dra. Karina Medina

Dra. Caterina Rufo, Directora

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer:

A Caterina Rufo, directora de tesis, por tu dedicación, paciencia y orientación a lo largo de este viaje académico. Tu dirección, llena de conocimiento y estímulo, ha sido fundamental para dar forma a esta investigación. Aunque mi interés por los hongos data de hace algunos años, te agradezco por haberme iniciado en el maravilloso mundo de los alimentos fermentados en estado sólido y sus cultivos iniciadores.

A Aminoteka, a todos sus integrantes pero en especial a Pinar Köksel, por enseñarme a elaborar tempeh! Gran responsable, junto a Caterina, de iniciarme en el mundo de los fermentados. Gracias por tu excelente disposición, cariño y por colaborar siempre con este trabajo.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) que apoyó este proyecto a través de la beca de posgrado POS_NAC_2021_1_170214 (Período 2022-2024).

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) que financió gran parte de este trabajo de posgrado mediante el proyecto de Vinculación Universidad - Sociedad y Producción (VUSP). Proyectos de Iniciativa Universitaria, Modalidad 2, titulado: “Desarrollo de un cultivo iniciador para la producción de tempeh” (Período 2022-2024).

A todos los integrantes del Instituto Polo Tecnológico de Pando (IPTP) que de una forma u otra, y muchas veces hasta sin saberlo, colaboraron en mi trabajo y en mi formación durante este tiempo. Especialmente agradecer a mis compañeras del laboratorio de Alimentos y Nutrición Belu, Gianna e Ile (actuales integrantes) así como a Jesi y Sole (ex integrantes) que compartieron mi estrés, enojos y alegrías durante el transcurso de la maestría. Trabajar con ustedes, codo a codo, no sólo ha sido una experiencia de aprendizaje enriquecedora, sino también una fuente de inspiración constante.

En especial a mi familia, por ser mis pilares en todo momento, por sentirse orgullosos de mis logros y ser mi apoyo incondicional siempre. A mis padres, Sonia y Omar, por enseñarme, desde muy pequeña, el verdadero valor del estudio, por ser mis referentes y motivarme siempre a seguir adelante. A mis hermanas, Aldu y Elo, por estar siempre, apoyándome, siendo mi sostén en todo momento. Sin ustedes, este logro no tendría el mismo sentido. Y finalmente, a Nico, por acompañarme en mis momentos de incertidumbre, por bancar y soportar mis locuras y mis cambios de humor en el transcurso de esta tesis.

¡A todos ustedes, GRACIAS!

RESUMEN

El tempeh es un alimento de origen vegetal con un alto contenido proteico (40-50%), resultado de un proceso de fermentación en estado sólido en el que intervienen legumbres y/o cereales y hongos filamentosos del género *Rhizopus* spp. Durante la fermentación el hongo crece formando una red de micelio, de color blanco y denso, que une los granos en un nuevo producto de valor agregado y estructura compacta.

El objetivo de ésta tesis fue seleccionar una cepa de crecimiento rápido de *Rhizopus oligosporus* de la colección de cultivo de la NRRL (ARS, USDA) para la producción local de tempeh y optimizar el proceso de elaboración de tempeh a base de una mezcla de garbanzo, quinoa roja y semillas de girasol (GQGir) como fuente de proteína de alta calidad.

Para ello se prepararon muestras mezclando los granos cocidos y acidificados (pH= 5.0-5.5) con esporas de las cepas NRRL 2549, 2710, 3271, 5865, 5905, 66266, 66270 y 66271 a una concentración de 1×10^4 esporas/g de grano húmedo y se incubaron a 32 °C. Se determinó la evolución del micelio a tiempo 0, 9, 12, 15, 20, 24 y 33 horas de fermentación. El desarrollo de micelio se evaluó a través de la determinación de ADN fúngico de cada cepa utilizando una qPCR adaptada a la matriz de trabajo. Las curvas de crecimiento fúngico de cada cepa se ajustaron utilizando la ecuación de Baranyi & Roberts (1994) y el software DMFit, para obtener los parámetros cinéticos principales como fase de latencia (λ o lag), tasa máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$), y concentración máxima ($Y_{m\acute{a}x}$). Luego, con la cepa seleccionada, se optimizó el proceso de fermentación del tempeh mediante el nivel de inóculo, la temperatura y el tiempo de fermentación. Y por último se determinó el contenido, composición y calidad de las proteínas y los lípidos en el nuevo tempeh.

Todas las cepas evaluadas mostraron crecimiento sobre los granos (entre 3,39-5,4 ng/g) y generaron micelio visible a excepción de la cepa NRRL 2549. Mediante el modelado de las curvas de crecimiento se determinaron diferencias en λ , $\mu_{m\acute{a}x}$ e $Y_{m\acute{a}x}$ entre las cepas, seleccionando la cepa NRRL 66271.

El tempeh GQGir obtenido en esta tesis, elaborado con la cepa NRRL 66271 y producido en condiciones optimizadas (nivel de inóculo: 3 log esporas/g, temperatura de fermentación de 33°C y tiempo de fermentación de 27 horas) puede definirse como una fuente de proteína de alta calidad conteniendo todos los aminoácidos esenciales sin presentar aminoácidos limitantes. Esta proteína está acompañada de un buen aporte de ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y ácidos grasos poliinsaturados (AGP) con bajo contenido de ácidos grasos saturados (AGS). El producto cumple con los requisitos analíticos propuestos por el Codex Alimentarius en la norma CODEX STAN-313-R para humedad y lípidos.

En conclusión, las cepas de *Rhizopus oligosporus*, sometidas a las mismas condiciones de elaboración, se comportaron distinto en cuanto a la generación de micelio y aroma, remarcando la importancia de la selección. La estrategia combinada de parámetros cinéticos y sensoriales permitió seleccionar una cepa con buenas características sensoriales para un tempeh de GQGir. NRRL 66271 fue seleccionada como la cepa con mayor capacidad de desarrollar tempeh y también por sus atributos sensoriales contando con una buena cepa para producir el inóculo a nivel local.

Para impulsar la producción de tempeh, se está avanzando en el desarrollo y producción nacional del cultivo iniciador utilizando la cepa NRRL 66271. La posibilidad de producirlo localmente aportará beneficios al sector productivo de alimentos nacional y a los consumidores que buscan incorporar otras fuentes de proteína a su dieta.

Palabras claves: tempeh, fermentación, *Rhizopus oligosporus*, qPCR, proteína vegetal

ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

AAE: Aminoácidos esenciales

AAS: Amino Acid Score / Puntuación de aminoácidos

ADN: Ácido desoxiribonucleico

AG: Ácido graso

AGS: Ácido graso saturado

AGM: Ácido graso monoinsaturado

AGP: Ácido graso poliinsaturado

ARS: Agricultural Research Service / Servicio de Investigación Agrícola

BAL: Bacterias ácido lácticas

CCA: Comisión del Codex Alimentarius

Ct: Cycle threshold / Ciclo umbral

EMBL: European Molecular Biology Laboratory / Laboratorio Europeo de Biología Molecular

FAME: Fatty Acid Methyl Ester / Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos

FAO: Food and Agriculture Organization / Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FDA: Food and Drugs Administration / Administración de Alimentos y Medicamentos

FINUT: Fundación Iberoamericana de Nutrición

GC-FID: Gas chromatography- flame ionization detector/ Cromatografía de gases con detector de ionización de llama

GQGir: Garbanzo, quinoa roja y semillas de girasol

GRAS: Generalmente reconocida como segura

IVPD: *In vitro* protein digestibility / Digestibilidad de la proteína *in vitro*

IVPDCAAS: Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score /Puntuación de aminoácidos corregido por digestibilidad de la proteína *in vitro*

NRRL: Northern Regional Research Laboratory

OMS: Organización mundial de la salud

PBS: Phosphate buffered saline / Buffer fosfato salino

PDA: Potato dextrose agar / Papa dextrosa agar

PDB: Potato dextrose broth /Papa dextrosa caldo

pH: - log [H⁺]

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RSM: Response surface methodology/ Metodología superficie de respuesta

ufc: Unidades formadoras de colonias

USDA: United States Department of Agriculture / Departamento de Agricultura de Estados Unidos

UV: Ultravioleta

λ : fase de latencia o retraso del crecimiento o fase lag (horas)

$\mu_{m\acute{a}x}$: Tasa de crecimiento máxima (ADN fúngico log/g/h)

Y_0 : Concentración de ADN de *Rhizopus oligosporus* en tempeh de GQGir predicho por la ecuación de Baranyi & Roberts (ADN fúngico log/g)

$Y_{m\acute{a}x}$: Concentración máxima de ADN de *Rhizopus oligosporus* en tempeh de GQGir predicho por la ecuación de Baranyi & Roberts (ADN fúngico log/g)

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	IV
ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
Tempeh	3
Proceso de elaboración del tempeh	4
Microflora del tempeh	5
<i>Rhizopus</i> spp. y <i>Rhizopus oligosporus</i>	6
Estructura de <i>Rhizopus oligosporus</i>	7
Cultivo iniciador para tempeh	8
Descripción del problema de estudio	9
3. OBJETIVOS	11
Objetivo general	11
Objetivos específicos	11
4. CAPÍTULO 1. Puesta a punto de una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para cuantificar el crecimiento de <i>Rhizopus oligosporus</i> durante la fermentación del tempeh	12
4.1. INTRODUCCIÓN	12
4.2. OBJETIVO	13
4.3. METODOLOGÍA	14
Adquisición y acondicionamiento de cepas de <i>Rhizopus oligosporus</i>	14
Preparación de micelio	14
Extracción de ADN fúngico a partir de micelio y de tempeh	14
Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real en tempeh de GQGir	15
Cuantificación de ADN de <i>Rhizopus oligosporus</i> a partir de micelio por qPCR	16
Influencia de la matriz en la cuantificación mediante qPCR	16
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
Puesta a punto de la qPCR para la cuantificación de ADN fúngico	17
Influencia de la matriz en el método qPCR diseñado para la cuantificación de ADN a partir de micelio fúngico	20
4.5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO	21
5. CAPÍTULO 2. Selección de una cepa de <i>Rhizopus oligosporus</i> con mayor potencial para producir tempeh de garbanzo, quinoa roja y semillas de girasol	22
5.1. INTRODUCCIÓN	22
Condiciones de la fermentación del tempeh	22

Etapas de la fermentación	23
Parámetros de calidad en el tempeh	25
Criterios de selección	25
Modelos de crecimiento microbiano	26
5.2. OBJETIVO	27
5.3. METODOLOGÍA	28
Preparación de esporas	28
Determinación de la concentración de esporas	28
Preparación de tempehs	29
Temperatura de fermentación y seguimiento de la temperatura interna del tempeh	30
Curvas de crecimiento de <i>Rhizopus oligosporus</i> : Determinación de ADN fúngico en el tempeh de GQGir	31
Ajuste de las curvas	32
Determinación de pH en el tempeh de GQGir	32
Aspecto visual y sensorial del tempeh de GQGir	32
5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
Curvas de crecimiento de <i>Rhizopus oligosporus</i> durante la fermentación del tempeh	33
Evolución del pH durante la fermentación del tempeh de GQGir	37
Aspecto visual y sensorial del tempeh de GQGir	38
5.5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO	41
6. CAPÍTULO 3. Optimización del proceso de fermentación en estado sólido de tempeh de garbanzo, quinoa roja y semillas de girasol	43
6.1. INTRODUCCIÓN	43
6.2. OBJETIVO	44
6.3. METODOLOGÍA	44
Diseño experimental	44
Preparación y análisis de los tempehs	44
Análisis de datos	44
Optimización del proceso de fermentación del tempeh de GQGir	45
6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
ADN fúngico, pH y humedad del tempeh de GQGir	45
Modelado del efecto del nivel de inóculo, de la temperatura de fermentación y el tiempo sobre la respuesta desarrollo fúngico, humedad y pH en el tempeh GQGir mediante RSM	47
Apreciación visual y sensorial del tempeh de GQGir	50
Optimización	52
6.5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO	53
7. CAPÍTULO 4. Perfil lipídico y calidad de la proteína en el nuevo tempeh	54
7.1. INTRODUCCIÓN	54

7.2. OBJETIVO	56
7.3. METODOLOGÍA	56
Contenido de proteínas	56
Perfil de aminoácidos y calidad de la proteína	57
Determinación de lípidos y perfil de ácidos grasos	58
7.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
Conformidad con la norma CODEX-STAN 313-R sobre contenido de humedad, proteínas y lípidos en el nuevo tempeh	58
Perfil de aminoácidos y calidad nutricional de la proteína	59
Perfil de ácidos grasos	61
7.5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO	62
8. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	64
9. REFERENCIAS	66
10. ANEXOS	73
Anexo A. Tablas	73
Anexo B. Temperatura interna del tempeh durante la fermentación	79
Anexo C. Procedimientos	80
Anexo D. Trabajos presentados en Congresos	82

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas del siglo XX, la nutrición en base a alimentos de origen vegetal ha sido de particular interés en el ámbito científico. El intento de identificar las dietas más beneficiosas para los seres humanos se inició a partir de datos obtenidos mediante estudios en países africanos, asiáticos y mediterráneos. Dichas poblaciones tenían, en promedio, las tasas más bajas de enfermedades no transmisibles relacionadas con la dieta y vivían una vida más larga. Las dietas tradicionales asiáticas y mediterráneas se basan principalmente en alimentos de origen vegetal, lo que sugiere que una dieta basada en estos alimentos proporciona beneficios a la salud que van más allá del suministro de nutrientes en cantidades adecuadas (Leitzmann, 2014, Niva, M. & Vainio, A., 2021).

Actualmente, la industria ganadera es considerada uno de los principales responsables de los graves problemas medioambientales. Se estima que es responsable del 18 % de emisiones de gases de efecto invernadero y ocupan grandes cantidades de suelo (70 % del uso de la tierra agrícola) y agua (20 % del consumo de agua dulce) para producir alimentos de origen animal (Bonny et al., 2015, Garibaldi et al., 2018). En consecuencia, la industria ganadera ha comenzado a ser cuestionada por su responsabilidad social y ambiental. Una de las alternativas para mitigar este problema es la incorporación de nuevas fuentes de alimentos para cuidar el medio ambiente. En este contexto, las proteínas de origen vegetal son ecológicamente menos intensivas en recursos naturales que las de origen animal en términos de huella de carbono, uso del agua y de la tierra (Poore et al., 2018; Renault, D., & Wallender, W. W., 2000). Sumado a esto, se ha evidenciado un aumento significativo de la demanda mundial de productos vegetarianos y/o veganos debido al aumento de personas que han decidido disminuir o eliminar el consumo de productos de origen animal, o aquellas personas que quieren tener más variedad en sus dietas incorporando diferentes fuentes de proteínas (UnivDatos Market Insights [UMI], 2020).

Muchos de los alimentos basados en proteínas vegetales son nutricionalmente densos, altos en fibras y su consumo puede contribuir a reducir los riesgos de enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes (Xiao 2016). Sin embargo, a pesar de sus beneficios, las proteínas de origen vegetal no ofrecen un sustituto completo de la proteína de origen animal, dadas sus limitaciones nutricionales. Estas limitaciones se deben, por un lado, a la falta de varios aminoácidos esenciales (AAE) y por otro a su menor digestibilidad en comparación con las proteínas de origen animal (Schaafsma 2000). Sin embargo, la combinación de diferentes fuentes vegetales puede compensar los AAE limitantes presentes en las fuentes individuales transformándose en una proteína completa o de alta calidad (Craig & Mangels, 2009, Marsh, 2013) y la digestibilidad de las proteínas puede aumentar significativamente mediante el procesamiento de los materiales vegetales (Craig & Mangels, 2009, Marsh, 2013, Nosworthy et al., 2018). La digestibilidad de las proteínas de las

legumbres y cereales es de 70- 80 % y este valor puede aumentar un 10-15% con el proceso de cocción y fermentación (Kumitch et al., 2019). Esto se debe a la transformación de compuestos complejos en compuestos más simples, producto del metabolismo enzimático de los microorganismos involucrados en el proceso de fermentación, así como a la eliminación de factores antinutricionales resultado del proceso de remojo y de cocción. Estos procesos, no sólo afectan la digestibilidad de algunos nutrientes, sino que también mejoran la biodisponibilidad de algunos aminoácidos y minerales (Angulo-Bejarano et al., 2008; Chandra-Hioe et al., 2016).



Figura 1. Tempeh. Alimento fermentado

Por lo tanto, para promover una alimentación con beneficios en la salud, con menor impacto ambiental y enfocada en personas que no consuman productos de origen animal se propone el desarrollo e incorporación en el país del alimento fermentado conocido como tempeh (Figura 1).

2. MARCO TEÓRICO

Tempeh

El tempeh es originario de Indonesia y es el alimento a base de soja más popular en esa región (Shurtleff, W., Aoyagi, A., 2021). Es comúnmente utilizado como alternativa a la carne por su textura, palatabilidad y particular sabor. Además, es rico en proteínas (40-50 % en base seca), bajo en grasas y grasas saturadas, libre de azúcar, alto en fibra, hierro y calcio y bajo en sodio (Ahnan-Winarno et al., 2021).

El tempeh resulta de la fermentación en estado sólido de la soja utilizando el hongo filamentoso del género *Rhizopus* spp. (*oligosporus*, *stolonifer*, *oryzae*) (Reyes- Moreno et al., 2004). Durante la fermentación del tempeh, el crecimiento del hongo produce un micelio algodonoso y denso de color blanco que une los granos en un nuevo producto de estructura compacta, y de valor agregado, que aporta versatilidad para su preparación y consumo (Reyes-Bastidas et al., 2010, Vital et al., 2018, Ahnan-Winarno et al., 2021). El tempeh tradicional es a base de soja pero otros tipos de legumbres (garbanzos, porotos, lentejas), granos (quinoa, amaranto), semillas (girasol, zapallo, lino) o mezclas de ellas pueden ser utilizadas como sustrato.

La Comisión del Codex Alimentarius (CCA), describe al tempeh como un producto compacto, blanco, en forma de torta, preparado a partir de semillas de soja hervidas descascaradas mediante fermentación en estado sólido con *Rhizopus* spp. (FAO/OMS, 2017). Los únicos inóculos o cultivos iniciadores reconocidos por la CCA para producir tempeh son *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae* y *Rhizopus stolonifer*. La textura del tempeh debe ser compacta y no se debe desintegrar fácilmente al cortarla con un cuchillo. Su color debe ser blanco debido al crecimiento del micelio de *Rhizopus* spp., limitando el grado de esporulación natural del inóculo. El sabor del tempeh debe ser carnoso, parecido al hongo y a la nuez, mientras que su olor debe ser fresco y sin ningún olor a amoníaco. Por lo general, el tempeh debe estar libre de aditivos alimentarios y de materias extrañas como otros granos, cáscaras y piedras pequeñas. La composición de tempeh debe tener un contenido mínimo de proteína del 15 %, un contenido máximo de humedad del 65 %, un contenido mínimo de lípidos del 7 % y un máximo de 2.5 % de fibra cruda (FAO/OMS, 2017) (Tabla 1).

Tabla 1. Factores de calidad organolépticas y requisitos analíticos para el tempeh según la Norma CODEX STAN 313R-2013.

Factores de calidad organolépticos		Requisitos analíticos	
Textura	Compacta	Humedad	máx. 65 %
Color	Blanco, con crecimiento abundante del micelio de <i>Rhizopus</i> spp	Proteínas	mín. 15 %
Sabor	Característico del tempeh, que recuerda a la nuez, la carne y las setas	Lípidos	mín. 7 %
Olor	Característico del tempeh fresco, sin olor a amoníaco	Fibra bruta	máx. 2.5 %

Proceso de elaboración del tempeh

La producción del tempeh se compone de las siguientes etapas: partido del grano, remojo, descascarado, cocción, filtración, secado, inoculación y fermentación, las que se representan en la Figura 2 (Nout & Kiers, 2005, Ahnan-Winarno et al., 2021). En la etapa de remojo se deja reposar el sustrato vegetal en agua (al menos 8 horas) para luego descartar el agua y seguir con la siguiente etapa. Este paso contribuye a la reducción de antinutrientes por acción enzimática. A continuación en el descascarado se retira la capa externa rica en fibra. Esta etapa es importante dado que la cáscara, según la CCA contiene antinutrientes y, por lo tanto, es considerada un contaminante del alimento. Luego se prosigue con la cocción, generalmente entre 20 y 40 minutos, dependiendo del sustrato utilizado. El agua resultante de este proceso se denomina aquafaba y es en ésta donde se retienen los oligosacáridos relacionados con los malestares digestivos. Se prosigue con la filtración y secado, que consisten en escurrir el agua remanente para reducir el contenido de humedad del sustrato. El valor óptimo de humedad para la fermentación es cercano al 40-50 %. Seguido a esto, se acidifica el sustrato mediante el agregado de vinagre hasta alcanzar un pH de 4.5-5.5 para prevenir el crecimiento de otros microorganismos y mantener un pH adecuado para el correcto crecimiento del hongo *Rhizopus* spp. (Reddy, Veena, & Savalgi, 2008). Finalmente, se procede a inocular con esporas fúngicas (cultivo iniciador), utilizando una relación sugerida de 1×10^4 unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g) para asegurar el correcto crecimiento del micelio y que resulte con la densidad deseada. El sustrato y el cultivo iniciador deben ser mezclados homogéneamente y luego se empaacan en bolsas perforadas a intervalos entre 1.2 y 1.9 cm para permitir una entrada de oxígeno lenta y homogénea.

La fermentación se considera completa cuando los granos quedan firmemente unidos, formando una torta compacta de aproximadamente 2 cm de espesor, totalmente recubierto por el micelio denso y blanco del hongo (Nout & Kiers, 2005; Shurtleff, W., Aoyagi, A., 2021).

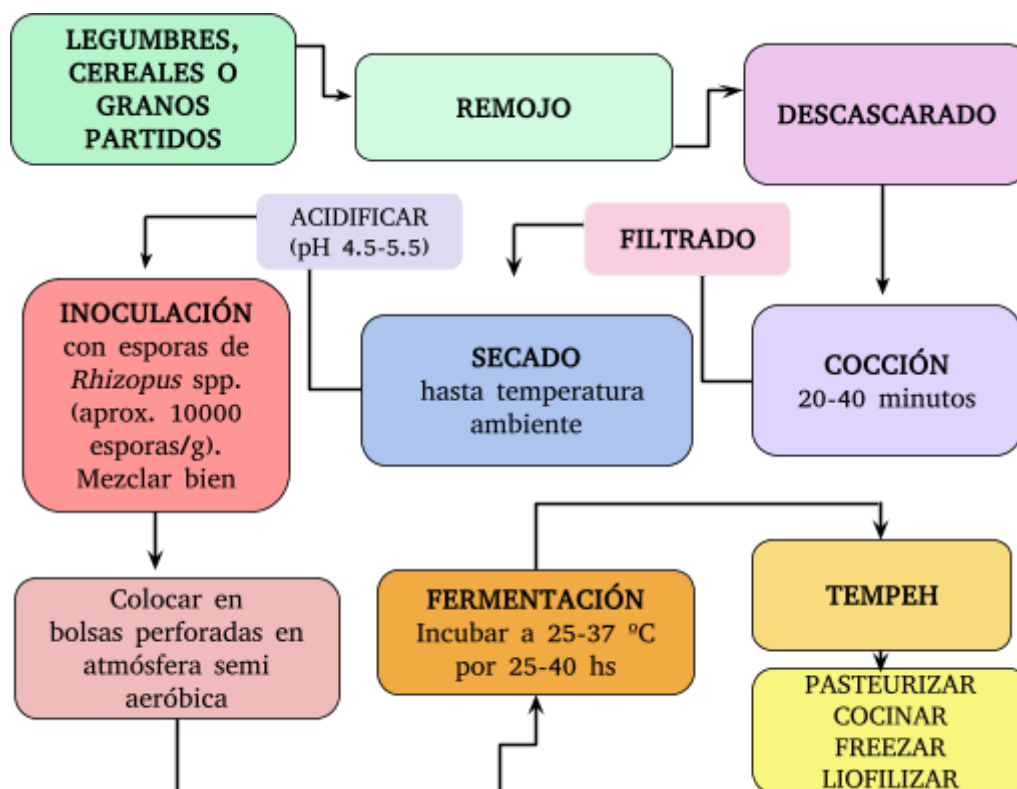


Figura 2. Proceso de elaboración de tempeh modificado de Ahnan- Winarno et al., 2021 y adaptado a la producción local.

Microflora del tempeh

La microflora responsable de la fermentación del tempeh está formada principalmente por *Rhizopus spp.* pero existe en el tempeh una flora normal acompañante compuesta por bacterias ácido lácticas (BAL) (Pisol et al., 2015) y levaduras (Wikandari et al., 2012). Las BAL (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*) actúan en primer lugar sobre los granos húmedos y son las responsables de acidificar el ambiente e impedir el crecimiento de microorganismos patógenos o contaminantes (Nout y Kiers, 2005, Feng et al., 2005). Posteriormente, durante la fermentación, interviene el *Rhizopus spp.* y los granos son transformados por la acción de sus enzimas (Tahir et al., 2018) que, junto a las BAL y levaduras, crean deseables propiedades sensoriales en el tempeh por la liberación de compuestos que contribuyen al

aroma y sabor (Jelén et al., 2013). Además, durante la fermentación el hongo produce metabolitos que le permiten inhibir a otros mohos y bacterias potencialmente dañinas (Shurtleff, W., Aoyagi, A., 2021; Jennessen et al., 2008; Tahir et al., 2018). Por ejemplo, *Rhizopus oligosporus* puede inhibir el crecimiento y la acumulación de aflatoxina B1 de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Tahir et al., 2018). También produce compuestos fenólicos que inhiben el crecimiento de *Helicobacter pylori* y se ha purificado una proteína antibacteriana con actividades contra *Bacillus* spp. (especialmente contra *Bacillus subtilis*), *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus cremoris* (Tahir et al., 2018).

Rhizopus* spp. y *Rhizopus oligosporus

Se han aislado varios géneros de hongos filamentosos del tempeh tradicional, pero los pertenecientes al género *Rhizopus* spp. son esenciales para la elaboración de tempeh (Owens & Astuti, 2015, Shurtleff, W., Aoyagi, A., 2021).

El género *Rhizopus* está formado por los grupos *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae* y *Rhizopus microsporus*. Este último grupo está formado por taxones con morfología similar e incluye las especies *Rhizopus homothallicus* y *Rhizopus microsporus*. Esta última especie se subdivide en cuatro variedades: var. *microsporus*, var. *rhizopodiformis*, var. *oligosporus* y var. *chinensis*.

Los más utilizados para la elaboración de tempeh son *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* (en adelante *Rhizopus oligosporus*) y *Rhizopus oryzae* (Tahir et al., 2018). *Rhizopus oligosporus* es una variedad de rápido crecimiento, no produce α -galactosidasa y, por tanto, no puede degradar compuestos como la estaquiosa y la rafinosa, tiene alta actividad proteolítica y lipolítica obteniendo gran parte de su energía de los lípidos, en particular del ácido oleico, y produce compuestos con alta actividad antioxidantes (isoflavonas como genisteína y daidzeína en tempeh de soja) (Tahir et al., 2018). Además, a diferencia de *Rhizopus oryzae*, tiene muy baja actividad amilasa por lo tanto es útil para fermentar legumbres, granos, semillas y mezclas de ellos con baja generación de ácidos orgánicos y sus aromas desagradables asociados (Nout & Kiers, 2005).

Rhizopus oligosporus se utiliza frecuentemente en la elaboración de tempeh dado que fue declarado en 2021 como una especie GRAS (generalmente reconocida como segura) por el Centro de Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, 2021).

Estructura de *Rhizopus oligosporus*

La caracterización del género es microscópica y como la mayoría de los hongos filamentosos *Rhizopus* está formado por una serie de filamentos tubulares grandes llamados hifas con un tamaño de 10 a 20 μm de diámetro que se ramifican y entrelazan para formar una estructura de alimentación denominado micelio (Figura 3-A y 3-B) (Owens & Astuti, 2015).

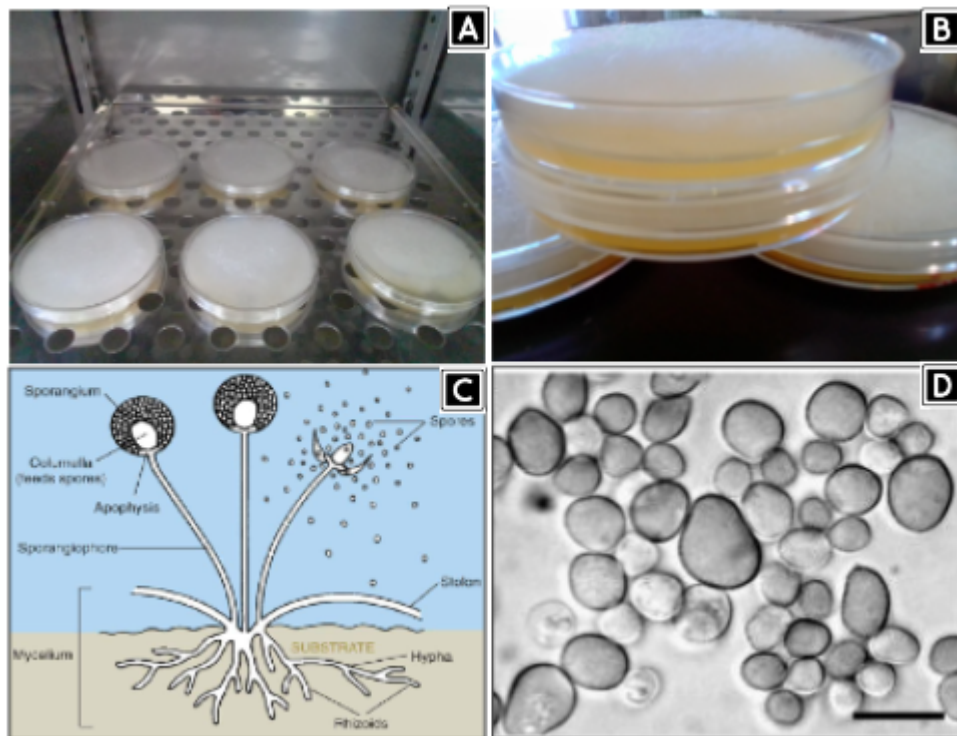


Figura 3. Micelio de *Rhizopus oligosporus* en placas de SDA incubadas a 28°C durante 48 horas (A) y (B). Estructura de *Rhizopus oligosporus* (C). Esporas fúngicas observadas mediante microscopía óptica de contraste de interferencia diferencial (LM-DIC) (D). Barra = 10 μm . Extraída de Jennessen et al., 2008).

En la Figura 3-C se muestra la estructura de *Rhizopus oligosporus*. Las hifas son aseptadas o cenocíticas, lo que significa que la estructura tubular de las paredes que constituyen la hifa no presenta septos o lo hace excepcionalmente. A partir de una hifa, o una espota, comienza a crecer una nueva hifa, que se extiende de manera apical (desde la punta) y cada hifa puede ser multinucleada y presentar ciento de núcleos flotando por el citoplasma (Owens & Astuti, 2015). Con el tiempo las hifas se ramifican y se entrelazan para formar el micelio. El micelio se denomina continuo y los núcleos, el citoplasma y los organelos se mueven libremente desde una región a otra (hacia los ápices de crecimiento). Inicialmente el micelio del hongo 'mina' su sustrato adquiriendo nutrientes. Posteriormente produce tres estructuras distintas, todas cenocíticas: (1) esporangióforos orientados verticalmente que llevan en su

extremo una estructura redonda, globosa con una pared simple, llamado esporangio, que produce y contiene innumerables esporas asexuales. Los esporangios se producen por simple diferenciación de la hifa de crecimiento al final de los esporangióforos. El tamaño de los esporangióforos es variable, dentro del género *Rhizopus* varía entre 20 a 140 μm de diámetro (Jennessen et al., 2008); (2) 'rizoides' similares a una raíz ubicados debajo de los esporangióforos. Están embebidos en el sustrato y permiten que los esporangióforos crezcan hacia arriba y (3) 'estolones' que propagan el hongo lateralmente y producen esporangióforos y rizoides donde se adhieren al sustrato. Solo dentro de la estructura productora de esporas se forman paredes celulares alrededor de núcleos individuales, formando células uninucleadas que se desarrollan en esporas las que se dispersan cuando el esporangio se abre al final de su desarrollo. Las esporas son grandes e irregulares con tamaños variables (hasta 43 μm de diámetro) (Figura 3-D) (Jennessen et al., 2008). Las esporas de *Rhizopus oligosporus* se clasifican como esporangiosporas debido a que son producidas dentro de los esporangios, (Jennessen et al., 2008).

Cultivo iniciador para tempeh

La elaboración del tempeh requiere de un cultivo iniciador o inóculo. (Shurtleff, W., Aoyagi, A., 2021). Un cultivo iniciador consiste en una o más cepas de una especie, o combinación de especies microbianas, que una vez adicionadas a un sustrato alimentario dan inicio a la fermentación (Herrera, 2006).

Se describen cuatro formas de preparar un cultivo iniciador para elaborar tempeh. Tres corresponden a formas tradicionales y una a la forma moderna. Las formas tradicionales consisten en (i) envolver los ingredientes cocidos en hojas de plátano que contienen esporas de *Rhizopus* spp. y esperar a que fermente, (ii) usar como cultivo iniciador un trozo de tempeh recién hecho y agregarlo a los ingredientes cocidos o (iii) utilizar como cultivo iniciador un trozo de tempeh esporulado (se corta una rebanada fina de la superficie de un tempeh recién hecho, se incuba hasta que la esporulación sea visible y la superficie adquiera un color gris oscuro o de algodón negro y se cosechan las esporas). Todas estas formas generan problemas de inocuidad, así como la pérdida de calidad del tempeh e inconsistencias en la producción (Chutrtong et al., 2014).

En cambio, en la producción moderna los cultivos iniciadores están elaborados con esporas provenientes de cepas puras de *Rhizopus* spp. cultivadas en sustratos vegetales como soja, arroz, yuca u otros sustratos similares (Shurtleff, W., Aoyagi, A., 2021). Estos suelen prepararse inoculando el sustrato, previamente esterilizado, con esporas provenientes de cepas fúngicas puras (Chutrtong et al., 2014) y se incuban a 30 - 32 °C hasta que la esporulación sea visible. Luego se seca, se tritura y se obtiene un concentrado en polvo conteniendo esporas, micelio y sustrato. Los cultivos preparados de esta manera se los

conoce como cultivos iniciadores puros ya que contienen esporas de una única cepa de hongos.

Los cultivos iniciadores recién preparados tienen un alto grado de germinabilidad, alrededor de un 69 %, correspondiente al porcentaje de esporas viables, es decir, aquellas esporas que germinan en un momento dado. A las cuatro o seis semanas de preparado el cultivo iniciador este porcentaje disminuye a 35 % permaneciendo constante hasta doce meses (Shurtleff, W., Aoyagi, A., 2021).

La ventaja de utilizar cultivos iniciadores producidos a partir de cepas puras, como en la producción moderna, permite estandarizar el proceso de elaboración del tempeh evitando problemas de contaminación, deterioro así como la pérdida de calidad del tempeh (Chutrtong et al., 2014).

Además, trabajar con cultivos iniciadores puros permite hacer una caracterización de las cepas según las características sensoriales de los tempeh que producen. De la misma manera que tempehs producidos a partir de diferentes fuentes de leguminosas, granos, semillas o mezclas de ellos, elaborados con la misma cepa de *Rhizopus oligosporus*, como cultivo iniciador, producen tempehs con diferente composición, calidad nutricional (humedad, proteínas, perfil de aminoácidos, fibra, etc), textura, aroma y sabor (Pilco et al., 2019, Erkan et al., 2020), tempehs elaborados con las mismas fuentes vegetales pero utilizando cultivos iniciadores provenientes de diferentes cepas de una misma especie (por ejemplo, cepas NRRL 2710 y NRRL 5905 de *Rhizopus oligosporus*), permiten obtener un producto final con texturas, aromas y sabores diferentes (Erkan et al., 2020). Las cepas de una misma especie fúngica pueden comportarse distinto aunque se sometan a las mismas condiciones de elaboración, produciendo compuestos aromáticos diferentes y mejorando las características sensoriales en el tempeh.

Descripción del problema de estudio

En Uruguay, existe actualmente una variedad limitada de proteínas de origen vegetal en comparación con otros países con niveles de ingreso per cápita similares. Localmente, el mercado de proteínas vegetales está restringido por la disponibilidad de fuentes de proteína completa que garanticen la ingesta de todos los aminoácidos esenciales. Esto es particularmente importante para las personas que evitan el consumo de proteínas de origen animal. Estas personas en general, son más conscientes de la calidad nutritiva de los productos que consumen, ya que su única fuente de proteínas son las proteínas vegetales.

Los productos que se encuentran en locales comerciales están mayoritariamente elaborados en base a soja. La soja tiene la gran ventaja de ser fuente de proteína completa, sin embargo su uso tiene algunos problemas, por un lado, es un potente alérgeno y, por el otro, las

prácticas agrícolas asociadas a su producción tienen un impacto ambiental negativo que generan rechazo. Otra forma posible de sustituir la proteína animal es mediante el consumo de mezclas de legumbres y granos de forma de obtener todos los aminoácidos esenciales. Sin embargo, muchas personas tienden a evitar estas alternativas debido a los problemas de digestión asociados a estos alimentos. Estos inconvenientes pueden ser subsanados por los procedimientos vinculados en la elaboración de tempeh como remojo, cocción y fermentación.

Actualmente en Uruguay, sólo existe una empresa registrada que comercializa tempeh. En un proyecto previo, en conjunto con la empresa se había establecido, en función de datos reportados sobre perfil de aminoácidos de distintos granos, la siguiente formulación para la producción de un tempeh alternativo al de soja formado por una mezcla de garbanzo (50%), quinoa roja (33%) y semillas de girasol (17%) resultando en un producto con proteínas de alta calidad

Sin embargo, una de las limitantes para la producción nacional de tempeh es la no disponibilidad en el país ni en la región del cultivo iniciador (*Rhizopus* spp.). Los cultivos iniciadores de tempeh comerciales provienen de Indonesia, EE. UU y Europa lo que provoca demoras en aduana, pérdida de viabilidad de las esporas y la posibilidad de no ser cultivos puros.

En ésta tesis se plantea seleccionar una cepa de *Rhizopus oligosporus* proveniente de la colección de la NRRL que sea capaz de fermentar y formar micelio en la mezcla de granos seleccionada y optimizar el proceso de elaboración del tempeh con la nueva cepa.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Seleccionar una cepa de *Rhizopus oligosporus* para la producción local de tempeh y optimizar el proceso de elaboración de tempeh a base de una mezcla de garbanzo, quinoa roja y semillas de girasol como fuente de proteína de alta calidad.

Objetivos específicos

-Desarrollar y validar un método de cuantificación de ADN específico para *Rhizopus oligosporus* adaptado a la matriz alimentaria de trabajo utilizando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

-Seleccionar una cepa con mayor potencial de producir tempeh elaborado a base de una mezcla de garbanzo, quinoa roja y semillas de girasol (GQGir) en una proporción de 50, 33 y 17% respectivamente, a partir de 8 cepas de *Rhizopus oligosporus* disponibles en la colección de cultivos del Laboratorio de Investigación Regional Norte (NRRL) del Servicio de Investigación Agrícola (ARS) del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA).

-Optimizar el proceso de fermentación en estado sólido del tempeh de garbanzo, quinoa roja y semillas de girasol con la cepa seleccionada mediante el nivel de inóculo, la temperatura de fermentación y el tiempo de fermentación.

-Determinar el contenido, composición y calidad de la proteína y de los ácidos grasos en el nuevo tempeh.

4. CAPÍTULO 1

PUESTA A PUNTO DE UNA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL PARA CUANTIFICAR EL CRECIMIENTO DE *Rhizopus oligosporus* DURANTE LA FERMENTACIÓN DEL TEMPEH

4.1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento fúngico puede cuantificarse midiendo la longitud de las hifas o por recuento de unidades formadoras de colonias en medios selectivos (Feng et al., 2007). Las determinaciones de microscopía directa de longitudes de hifas permiten la cuantificación diferencial del micelio, sin embargo, requiere de tiempo, experiencia y tiene un alto error experimental (Feng et al., 2007). Por otro lado, el recuento en placa, para hongos filamentosos formadores de esporas como *Rhizopus oligosporus* en presencia de otros microorganismos no es el ideal. La Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR) en tiempo real, puede superar los problemas de los métodos convencionales y ha sido utilizada para la cuantificación rápida del crecimiento fúngico en distintas matrices alimentarias (Feng et al., 2007). Con la qPCR se obtiene una medida indirecta del crecimiento fúngico ya que la cantidad de ADN se correlaciona con la cantidad de micelio (Feng et al., 2007).

La qPCR es una técnica *in vitro* que permite amplificar una región específica de ADN delimitada por dos primers o cebadores, mediante ciclos de calentamiento y enfriamiento sucesivos, utilizando compuestos fluoróforos que permiten seguir la amplificación del ADN en cada ciclo en tiempo real (Livak KJ & Schmittgen TD. 2001). Para cada reacción de amplificación se define un Ct (Cycle threshold o ciclo umbral), ciclo en el cual la fluorescencia supera el umbral de ruido y es detectada. Durante la fase exponencial de la amplificación el Ct es proporcional al logaritmo de la concentración de ADN en la reacción. La eficiencia de amplificación (E) de los productos de ADN se determina a partir de la amplificación de diluciones en serie del respectivo ADN diana según Wilhelm y Pingoud (2003): $E = 10^{[-1/pendiente]}$, donde la pendiente se calcula a partir de la curva estándar de concentraciones de ADN frente a los valores de ciclo umbral o cycle threshold (Ct).

Feng et al., (2007) cuantificaron ADN de *Rhizopus oligosporus* extraído de tempeh de cebada, mediante qPCR en tiempo real utilizando SYBR green como fluoróforo reportero. El gen diana seleccionado para la detección de *Rhizopus oligosporus* fue el gen *chs1*, que codifica una quitina sintasa, número de acceso EMBL D10159. Las secuencias y las

temperatura de hibridación o temperatura de melting (T_m) de los primers específicos, así como la longitud del amplicón (producto de qPCR) se muestran en la Tabla 2.

La eficiencia de amplificación máxima teórica (valor E) de la qPCR en tiempo real de un ciclo de amplificación es 2 (Wilhelm y Pingoud, 2003) y el valor E determinado por Feng et al., (2007) fue de 1.95 para el gen *chs1* de *Rhizopus oligosporus*, demostrando que la qPCR desarrollada puede ser un método rápido, confiable y selectivo para la cuantificación de hongos filamentosos en el tempeh de cebada y que también puede ser posible aplicarlo en otras fermentaciones de alimentos y piensos en estado sólido eligiendo combinaciones de primers apropiadas.

Tabla 2. Características de los primers para la cuantificación de ADN de *Rhizopus oligosporus* mediante qPCR en tiempo real.

Primer	Secuencia	T_m (°C)	Longitud amplicón (pb)	Gen diana	Ref.
R.olig 1F	5'-GTCCCCTTCTTAAGCCCAATG-3'	61.3	62	<i>chs 1</i>	Feng et al., 2007
R.olig 1R	5'-GCGACCACCAGGCTTTGTAC-3'	62.5	62	<i>chs 1</i>	Feng et al., 2007

4.2. OBJETIVO

Desarrollar y validar un método de cuantificación de ADN específico para *Rhizopus oligosporus* adaptado a la matriz alimentaria de trabajo utilizando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) el cual se utilizará luego para la selección de la cepa.

Para ello se plantearon las siguientes actividades:

- Comprobar la especificidad de la reacción de qPCR y de los primers descritos por Feng et al., 2007 en extracciones de ADN extraído a partir de micelio de ocho cepas de *Rhizopus oligosporus*.
- Realizar la curva de calibración a partir de un estándar de ADN de *Rhizopus oligosporus* y determinar el ADN fúngico mediante qPCR con la curva diseñada.
- Verificar si existe efecto de la matriz alimentaria en el método de cuantificación por qPCR.

4.3. METODOLOGÍA

Adquisición y acondicionamiento de cepas de *Rhizopus oligosporus*

Se solicitaron a la Colección de Cultivos del NRRL, ARS, USDA, ocho cepas de *Rhizopus oligosporus*: NRRL 2549, NRRL 2710, NRRL 3271, NRRL 5865, NRRL 5905, NRRL 66266, NRRL 66270, NRRL 66271, todas aisladas de tempeh (ver Anexo A. Tabla 14). Esta colección no limita el uso de las cepas pudiendo utilizarse en procesos productivos. Las cepas se recibieron liofilizadas en viales conteniendo células viables (micelio y esporas) en una suspensión espesa en suero bovino estéril. El procedimiento para la activación recomendado por la NRRL, consistió en: (i) limpiar el tubo con alcohol al 70%, (ii) romper el tubo, (iii) transferir el pellet a 2 ml de medio de cultivo líquido de papa dextrosa (PDB- marca OXOID), (iv) permitir que el pellet se disuelva durante varios minutos, luego llevar al vortex para homogeneizar la suspensión.

Para la conservación de las cepas se sembraron 10 µL con ansa estéril en tubos de PDA inclinado y se llevaron a estufa a 28 °C hasta que la esporulación fue visible y la superficie adquirió un color oscuro como algodón negro, aproximadamente a los 7 días. De éstos tubos se tomaron esporas con ansa estéril, se colocaron en crioviales, los cuales contenían 1 ml de glicerol al 10 % (Meza et al., 2002) y se guardaron en freezer a -80 °C.

Preparación de micelio

Para la preparación de micelio se tomaron, con ansa estéril, 10 µL del stock de esporas de *Rhizopus oligosporus* conservado a -80 °C y se colocaron en matraces con 100 ml de medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (PDB-marca OXOID). Se incubaron en una estufa Thermo Scientific Heraeus a 28°C y a las 48 horas se cosechó todo el micelio utilizando un ansa estéril (Figura 4-A y 4-B). El micelio obtenido, se congeló a -80°C durante 4 horas y luego se colocó en un liofilizador Christ GAMMA 1- 16 LSC durante 48 horas en las siguientes condiciones: temperatura de condensador de -55 °C y presión de sublimación del hielo de 0,021 mbar. Una vez seco se molió utilizando una varilla de vidrio y se almacenó en desecador a temperatura ambiente para luego realizar la extracción de ADN.

Extracción de ADN fúngico a partir de micelio y de tempeh

La extracción de ADN se realizó mediante la utilización del kit comercial Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Zymo. Para la extracción de ADN a partir de micelio, la muestra se preparó homogeneizando 30 mg de micelio liofilizado en 1 ml de buffer fosfato salino (PBS), se tomaron 200 µL y se continuó con el procedimiento indicado por

el fabricante del kit (ver Anexo C. 2). En el caso del tempeh, la muestra para la extracción se preparó a partir de 3 g de tempeh (liofilizado y molido) en 30 ml de PBS, se homogeneizó 2 minutos en stomacher, se realizó una toma de 2 ml de la muestra y se centrifugó a 10000 rpm durante 2 minutos.

Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 750 µL del buffer de lisis BashingBead™, por último la muestra se pasó al tubo de lisis ZR BashingBead™ para continuar con el procedimiento del kit (ver Anexo B. Sección B.2). El ADN obtenido se alícuotó y se almacenó a -20 °C. El ADN se cuantificó mediante espectrofotometría UV usando el equipo Thermo Scientific, NanoDrop™ Lite para determinar la concentración (ng/µL) y la pureza (A260/280) de las muestras (ver Anexo A. Tabla 15).

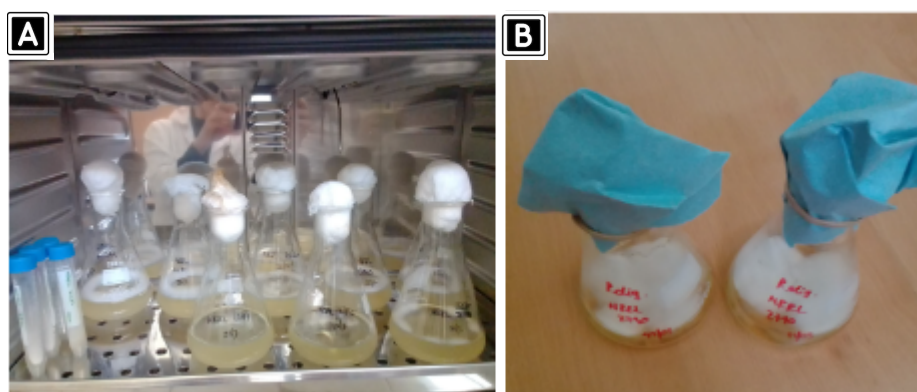


Figura 4. (A) Esporas de *Rhizopus oligosporus* sembradas en medio líquido de papa y dextrosa (en matraces) y en medio sólido de papa y dextrosa (en tubos de agar inclinado) a las 24 horas en estufa a 28 °C y (B) micelio de *Rhizopus oligosporus* (NRRL 2710) a las 48 horas.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real en tempeh de GQGir

Se utilizó la qPCR descrita por Feng et al., (2007), donde se utilizan para la cuantificación de *Rhizopus oligosporus* primers específicos que amplifican un fragmento del gen *chs1* que codifica una quitina sintasa, número de acceso EMBL D10159.

Para la qPCR se utilizaron los pares de primers R.olig 1F (5' -GTCCCCTTCTTAAGCCCAATG-3') y R.olig 1R (5' -GCGACCACCAGGCTTTGTAC-3') específicos para *Rhizopus oligosporus*. El programa térmico para la reacción consistió en un ciclo de activación de ADN polimerasa de 3 minutos a 98 °C, seguido de 30 ciclos de amplificación de 5 segundos a 98 °C y 30 segundos a 63 °C. Luego se realizó la curva de desnaturalización de los productos de la amplificación mediante el aumento gradual de la temperatura de 63 a 95 °C en 20 minutos (± 0.6 °C/20 segundos) utilizando el termociclador Rotor-Gene Q. La reacción se realizó en

un volumen final de 20 μL con 10 μL de Supermix Sso Advanced Universal SYBR® Green BIO RAD, compuesto por la enzima Taq ADN polimerasa, dNTP's, el buffer y el SYBR GREEN, 3 μL de ADN muestra, 1 μL de cada primer y 5 μL de agua milliQ. Se agregaron dos blancos (sin ADN) y todas las reacciones se realizaron por duplicado. La reacción se llevó a cabo en un equipo termociclador Rotor-Gene Q (Quiagen, Venlo, Netherlands). El software utilizado fue la versión Rotor-Gene 2.1.0.9.

Cuantificación de ADN de *Rhizopus oligosporus* a partir de micelio por qPCR

Para la obtención de la curva estándar o de calibración se procedió a realizar la qPCR a partir de diluciones seriadas en agua destilada estéril (4.3 a 4.3×10^{-4} ng/ μL) utilizando como estándar de ADN la cepa *Rhizopus oligosporus* NRRL 66271. Para cada concentración se determinó el ciclo threshold. Los valores de Ct de las curvas de cada dilución se graficaron contra el logaritmo de la concentración de ADN fúngico presente en la muestra y los puntos de la curva se ajustaron a una recta mediante una regresión lineal (Livak KJ & Schmittgen TD. 2001).

A partir de la curva se determinó el coeficiente de correlación R^2 , la pendiente y la eficiencia (E) de la reacción de amplificación mediante la siguiente fórmula:

$$E = 10^{[-1/\text{pendiente}]}$$

Los valores requeridos para una buena cuantificación son: $R^2 > 0.99$, pendiente de la recta cercana o igual a $-3.32 \log \text{ ng}/\mu\text{L}^{-1}$ y eficiencia de la amplificación de 100 % (adecuada eficiencia entre $100 \% \pm 10 \%$) (Livak KJ & Schmittgen TD. 2001).

Influencia de la matriz en la cuantificación mediante qPCR

Para determinar el efecto de la matriz en la cuantificación se realizó una extracción de ADN de la matriz alimentaria a utilizar durante el trabajo de tesis con el kit comercial Zymo. Para ello se elaboró una muestra a base de 50 % de garbanzo, 33 % de quinoa roja y 17 % de semillas de girasol, cruda molida y estéril. La muestra para la extracción de ADN se preparó homogeneizando 3 g de la mezcla preparada en 30 ml de PBS, se tomaron 2 ml y se centrifugó 1 minuto a 10000 rpm y el pellet obtenido se suspendió en el buffer del kit y se continuó con el procedimiento indicado por el fabricante del kit. El extracto se utilizó como solución para preparar las diluciones 1/10 de la curva estándar. En paralelo se realizó una curva estándar en agua destilada estéril en las condiciones mencionadas previamente. Todas las muestras se prepararon por duplicado.

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Puesta a punto de la qPCR para la cuantificación de ADN fúngico

Todas las cepas estudiadas de *Rhizopus oligosporus* pudieron ser amplificadas utilizando los primers reportados por Feng. et al., 2007 (Figura 5).

Las curvas de las cepas de *Rhizopus oligosporus* amplificaron con valores de Ct cercanos entre sí a excepción de la curva correspondiente a la cepa NRRL 2710 que su amplificación estuvo más desplazada hacia la derecha, esto es consecuente con que tuvo una concentración de ADN inicial menor y por lo tanto un Ct mayor.

La Figura 6 muestra la curva de disociación donde los primers seleccionados amplificaron el ADN de *Rhizopus oligosporus* obteniéndose un único producto (pico) de amplificación que sugiere la especificidad de la reacción, es decir, que los productos de qPCR que se formaron serían del tamaño esperado con valores de Tm entre 81,10 y 82,00 °C dentro del valor reportado por Feng et al., 2007 para *Rhizopus oligosporus* (82 °C $\pm$ 1 °C).

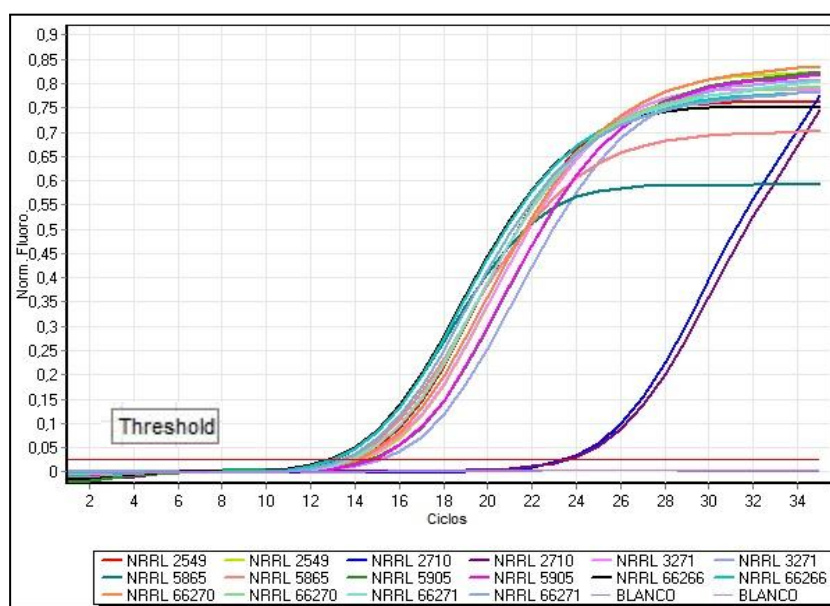


Figura 5. Curva de amplificación de las 8 cepas de *Rhizopus oligosporus* obtenidas con SYBR® Green.

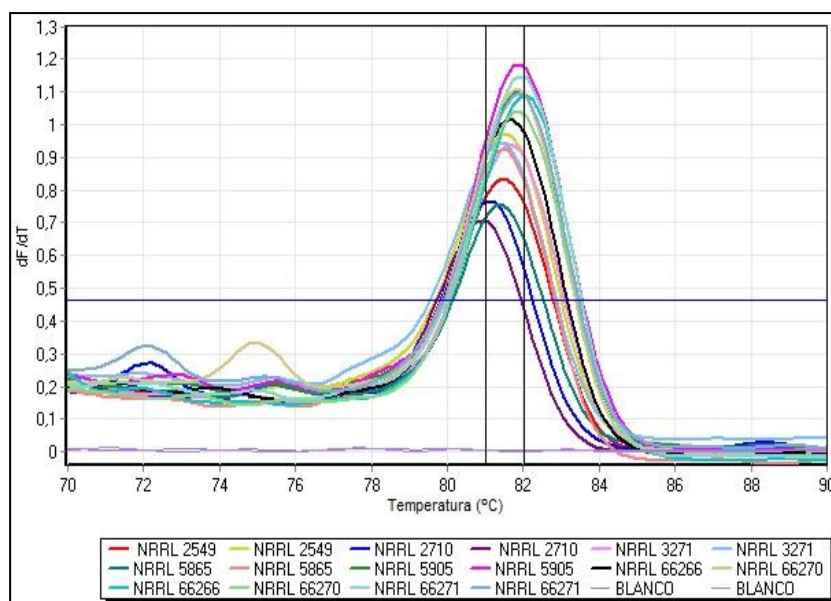


Figura 6. Curva de disociación de las 8 cepas de *Rhizopus oligosporus* obtenidas con SYBR® Green

La Figura 7-B muestra la curva estándar obtenida a partir de los valores de Ct de la curva de amplificación del estándar de *Rhizopus oligosporus* NRRL 66271 (Figura 7-A). La pendiente de la curva fue $-3.2 \log \text{ ng/}\mu\text{l}^{-1}$ y la eficiencia de la reacción de amplificación en el rango lineal calculada a partir de la pendiente de la curva fue del 102 %, lo que indica que el ensayo qPCR fue altamente eficiente con un valor de $R^2 > 0.99$.

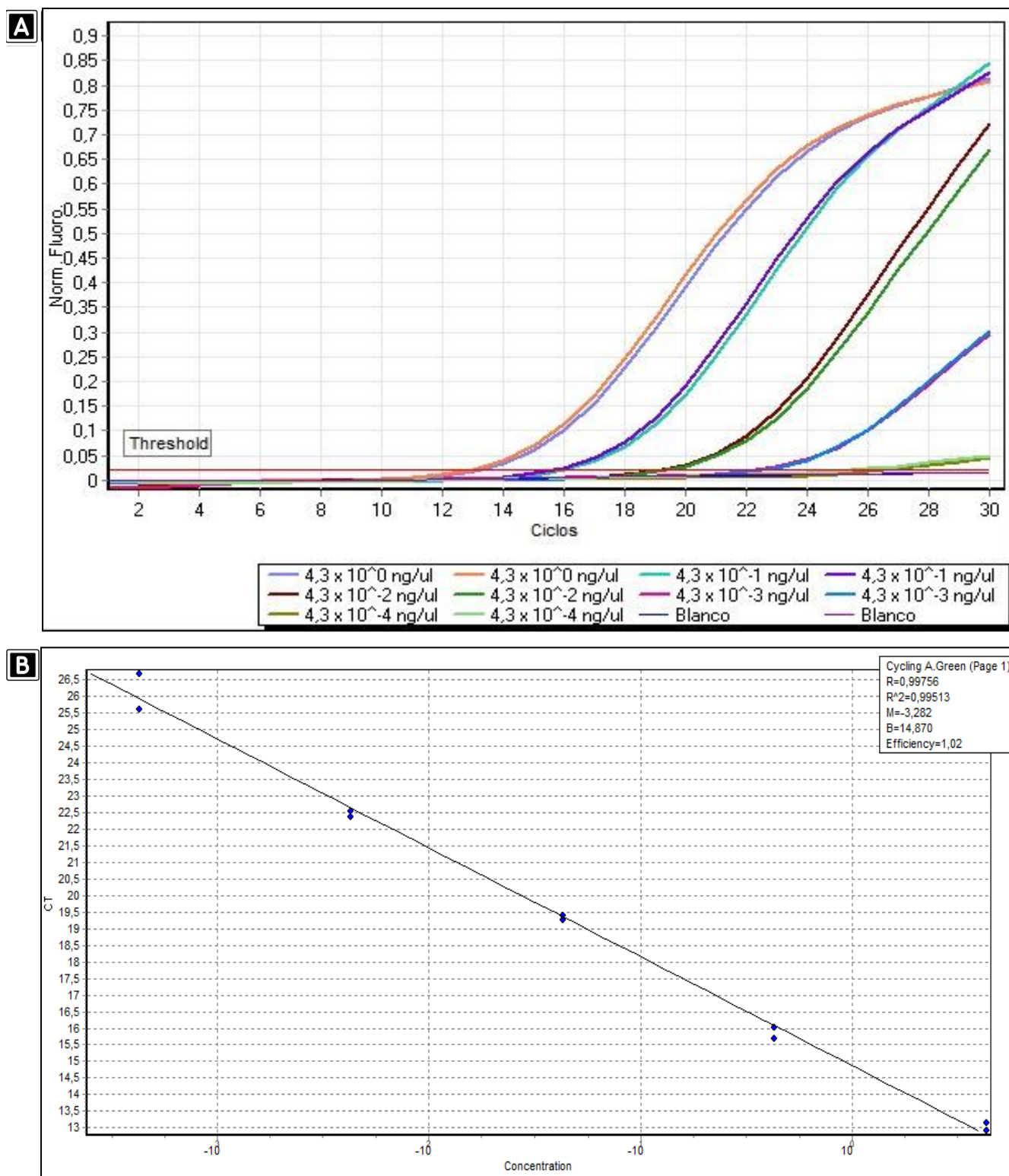


Figura 7. (A) Curva de amplificación de qPCR obtenida con SYBR® Green y (B) curva de calibración.

La curva de calibración se realizó en cada cuantificación para evitar variaciones debido a los reactivos de uso en cada ocasión. Se cuantificó (por triplicado) ADN fúngico de cada cepa de *Rhizopus oligosporus* mediante dos métodos, qPCR y espectrofotometría UV (ver Anexo A. Tabla 16). Luego se realizó un análisis de correlación entre los valores obtenidos por qPCR y la cuantificación realizada por espectrofotometría UV. Se obtuvo una relación lineal con un coeficiente de correlación de Pearson de 0.998 (Figura 8). Por lo tanto se considera que la curva estándar obtenida con la cepa NRRL 66271 es adecuada para la cuantificación de todas las cepas de *Rhizopus oligosporus* usadas en este estudio.

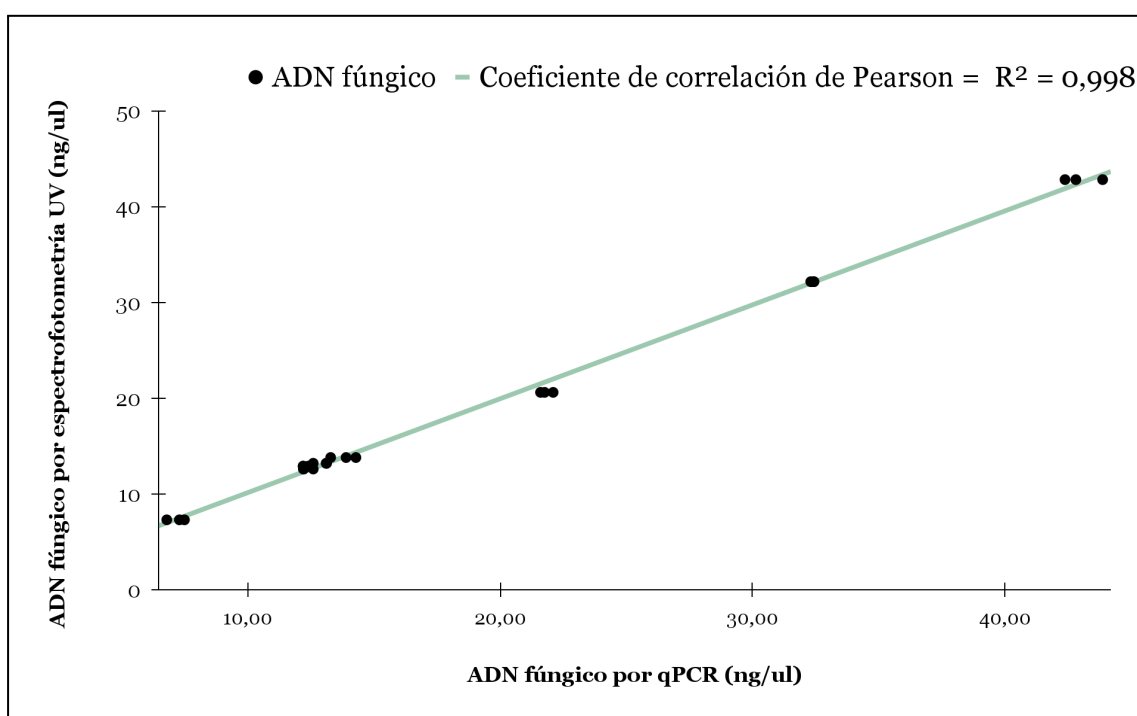


Figura 8. Correlación lineal de los valores de concentración de ADN fúngico de *Rhizopus oligosporus*, cuantificados mediante qPCR y por espectrofotometría UV.

Influencia de la matriz en el método qPCR diseñado para la cuantificación de ADN a partir de micelio fúngico

Se compararon los Ct obtenidos de las dos curvas de calibración preparadas en agua y en extracto de granos sin inocular y se graficaron en función de la concentración de ADN fúngico. Como resultado se observa que las curvas se superponen (Figura 9). No se observó influencia de la matriz en estudio, en las condiciones del ensayo, ya que al comparar los Ct de las curvas de amplificación entre sí, a la misma concentración, la diferencia fue menor a 0.5 Ct y por lo tanto no existe diferencia significativa entre los valores de Ct de las curvas de calibración (Cankar et al., 2006) (ver Anexo A. Tabla 17).

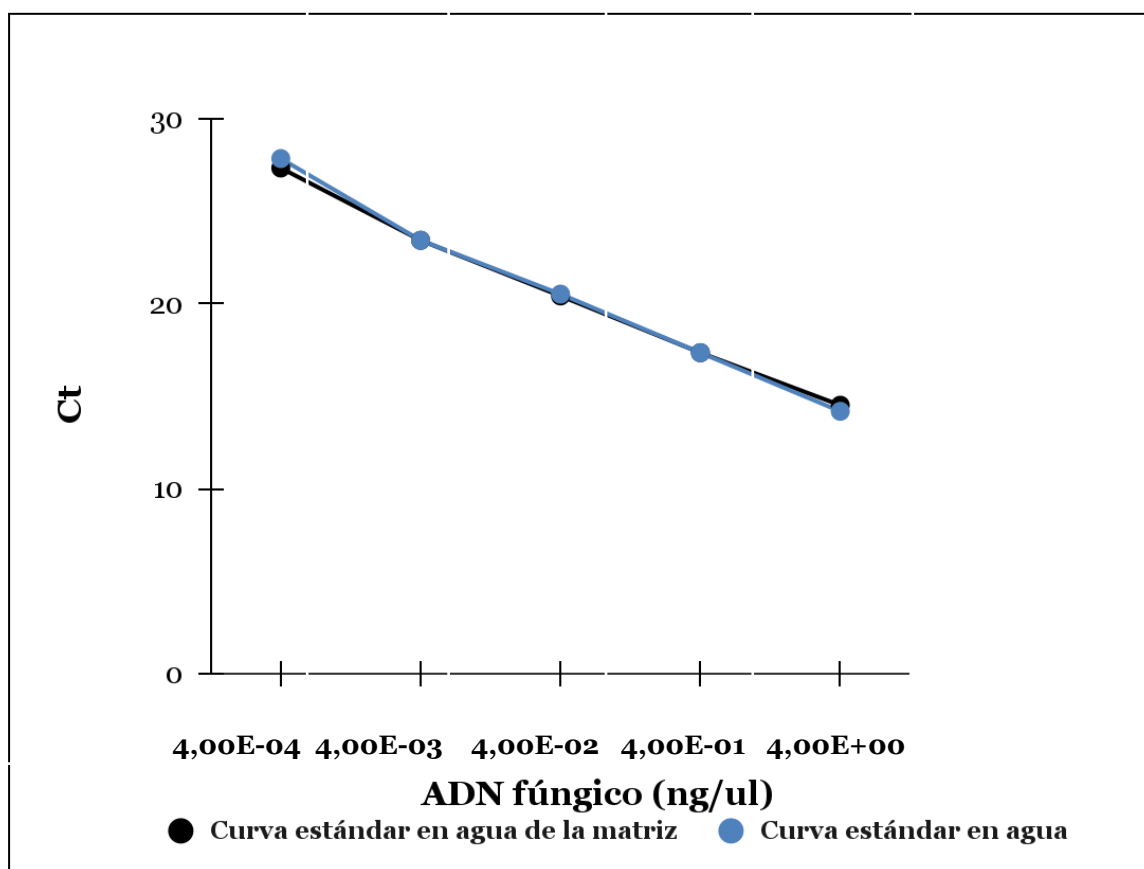


Figura 9. Valores de Ct en función de la concentración de ADN fúngico obtenidos de la curva de calibración en agua y la curva de la matriz en agua mediante qPCR.

4.5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

Se puede concluir que el método de qPCR implementado es adecuado para la cuantificación de todas las cepas de *Rhizopus oligosporus* evaluadas. Con respecto a la eficiencia de la reacción de PCR en tiempo real la misma se encontró dentro del rango esperado (90 y 110 %) (Rebrikov et al., 2006), por lo cual se puede inferir que la amplificación ha funcionado correctamente en el rango de concentraciones estudiado y sin interferencias. Es pertinente utilizar la curva de calibración obtenida con la cepa NRRL 66271 para determinar las concentraciones de ADN fúngico de las otras cepas ya que la cuantificación mediante la curva estándar correlaciona con la cuantificación mediante espectrofotometría UV para todas las cepas. Éste método no presentó inhibición por la matriz; la fluorescencia generada en presencia de la mezcla de GQGir no difiere de la generada en presencia de agua, por lo que se cuenta con un método rápido, selectivo y adecuado que podrá ser aplicable para la cuantificación de *Rhizopus oligosporus* en tempeh de GQGir.

5. CAPÍTULO 2

SELECCIÓN DE UNA CEPA DE *Rhizopus oligosporus* CON MAYOR POTENCIAL PARA PRODUCIR TEMPEH DE GARBANZO, QUINOA ROJA Y SEMILLAS DE GIRASOL

5.1. INTRODUCCIÓN

Condiciones de la fermentación del tempeh

La fermentación en estado sólido, utilizada en la elaboración de tempeh, se define como el crecimiento de microorganismos, en su mayoría hongos, en la superficie de un sustrato sólido poroso y húmedo, esta humedad es suficiente para mantener el crecimiento y metabolismo microbiano. Este proceso se realiza en la ausencia o casi ausencia de agua líquida visible entre las partículas. Esta condición favorece el desarrollo de hongos filamentosos, como *Rhizopus* spp. debido a su peculiar capacidad para colonizar los espacios entre las partículas de matrices sólidas (Mazaheri and Shojaosadati, 2013).

En este tipo de fermentación, la composición química de los sustratos, la humedad del grano y el pH en conjunto con las condiciones del proceso como la aireación, la temperatura de fermentación y el nivel de inóculo inciden directamente en el metabolismo del microorganismo y en los resultados del proceso.

Los granos utilizados contienen fuentes de carbono y nitrógeno necesarias para el desarrollo del *Rhizopus*, además para facilitar el acceso a los mismos los granos se parten, remojan y descascaran. El tamaño de las partículas es inversamente proporcional a la accesibilidad del hongo a las sustancias en el interior de la partícula. Algunos estudios de la penetración de micelio de *Rhizopus oligosporus* en soja, han determinado que este se introduce hasta el 25 % del espesor de la semilla (Sparringa y Owens 1999a). La reducción de tamaño es una manera de facilitar el alcance a las partes más profundas del grano por este motivo los granos utilizados para elaborar tempeh se parten previamente antes del remojo.

La humedad garantiza el crecimiento y afecta directamente el metabolismo del hongo (Kuswanto, 2004). Se ha observado un buen desarrollo de micelio cuando la humedad del grano al inocular está entre 40 y 50 %.

El pH al momento de la inoculación debe estar entre 5.0 y 5.5 y se espera que aumente durante la fermentación hasta 6.5-7.5. La actividad de las enzimas del *Rhizopus* requiere de un rango de pH entre 3.0 y 6.0 (Nout & Kiers, 2005). Durante la fermentación el pH

aumenta por la actividad proteolítica del *Rhizopus*, generando amonio, el cual disminuye la producción de biomasa debido a la inhibición por producto (Sparringa y Owens, 1999). Por otro lado, el pH al momento de la inoculación entre 5.0 y 5.5 minimiza el desarrollo de bacterias patógenas y bacterias de deterioro durante la fermentación (Nout & Kiers, 2005).

Dado que *Rhizopus* spp. es aerobio estricto se requiere una difusión de aire lenta y uniforme a través de la masa de granos que debe estar entre 2 y 5 cm de espesor para permitir la difusión del oxígeno (Nout & Kiers, 2005; Tahir et al., 2018). *Rhizopus* puede crecer en concentraciones bajas de oxígeno 0.2 %, pero no puede vivir en condiciones totalmente anaeróbicas. Insuficiente oxígeno inhibe el desarrollo y por otro lado un exceso de oxígeno puede conducir a un metabolismo del hongo acelerado con un aumento exacerbado de temperatura que lo dañe o induzca a una esporulación temprana (Nout & Kiers, 2005; Tahir et al., 2018).

La fermentación del tempeh se da a temperaturas entre 25 y 37 °C y usualmente tarda entre 25-40 horas (Nout & Kiers, 2005). *Rhizopus oligosporus* puede crecer en un rango de temperaturas entre 30 y 37 °C, mientras más alta sea la temperatura del proceso de fermentación menor será la fase de latencia (Tahir et al., 2018). El metabolismo fúngico disipa calor durante la fermentación, por tanto la temperatura de la cámara de fermentación debe controlarse para impedir que la temperatura de la masa (temperatura interna) sobrepase los 45 °C y no se inhiba el crecimiento (Nout & Kiers, 2005, Tahir et al., 2018).

El nivel de inoculación también afecta el desarrollo de la fermentación. En general se inocula en una relación de 1×10^4 esporas por gramo de sustrato húmedo. Bajos niveles de inoculación en el cultivo inicial del orden de 1×10^2 , o menos, tiene como consecuencia la falta de homogeneidad en el desarrollo del micelio, mayores periodos de fermentación y altas posibilidades de descomposición bacteriana. En cambio, altos niveles de inoculación provocan una fermentación excesiva con un aumento de temperatura interna en el tempeh que conduce a la muerte prematura del hongo.

Etapas de la fermentación

Durante la fermentación del tempeh se identifican tres fases (Figura 10), en la primera fase o fase rápida (0-30 horas) las principales enzimas fúngicas activas son las lipasas y las proteasas, por lo que tiene lugar una rápida generación de ácidos grasos libres y un rápido aumento del pH cercano a 6.3 - 6.5 (Sparringa & Owens, 1999b) (Figura 11). En esta etapa comienza el crecimiento fúngico y de las bacterias, en general bacterias ácido lácticas, que sobreviven al proceso de ebullición y forman parte de la flora normal acompañante del tempeh. Durante este tiempo, la temperatura en el centro de la masa del tempeh comienza a aumentar rápidamente hasta igualar la temperatura de la cámara de fermentación, donde permanece constante durante aproximadamente quince horas. Luego, cuando el tempeh

comienza a producir su propio calor para la fermentación, la temperatura interna comienza a aumentar constantemente hasta un máximo de 43 °C, o más de 10 °C por encima de la temperatura de la cámara (Figura 11). Durante las primeras 15 a 20 horas, el crecimiento fúngico progresa lentamente y normalmente no es visible a simple vista. Las hifas de color blanco plateado se conectan entre sí y entre los granos formando rápidamente una red tridimensional llamada micelio. Dicho micelio se vuelve gradualmente más grueso y denso cubriendo rápidamente los espacios entre los granos manteniéndolos juntos y otorgando al tempeh una textura compacta. Esto sucede a medida que la temperatura se acerca a su punto máximo. El micelio penetra en varias capas de células del grano hasta aproximadamente el 25% del ancho del cotiledón. Es en este momento cuando los granos quedan totalmente cubiertos por el micelio fúngico. Luego viene una segunda fase o fase de transición (30 a 50 horas). Al inicio de esta fase el tempeh está listo para cosechar, alcanzando la textura óptima, puntuaciones organolépticas adecuadas, un pH alrededor de 6.5-7.5 y una humedad en el entorno del 60 %. Además, la temperatura interna de la masa del tempeh comienza a bajar hasta igualar la temperatura de la cámara, mientras que la producción de ácidos grasos libres y el crecimiento fúngico y microbiano se enlentecen (Sparringa & Owens, 1999a).

Con respecto al sabor, color, textura y aroma que alcanza el tempeh, son más atractivas al comienzo de la segunda fase de la fermentación. Mantiene su calidad durante toda ésta etapa, pero comienza a deteriorarse durante el comienzo de la tercera fase.

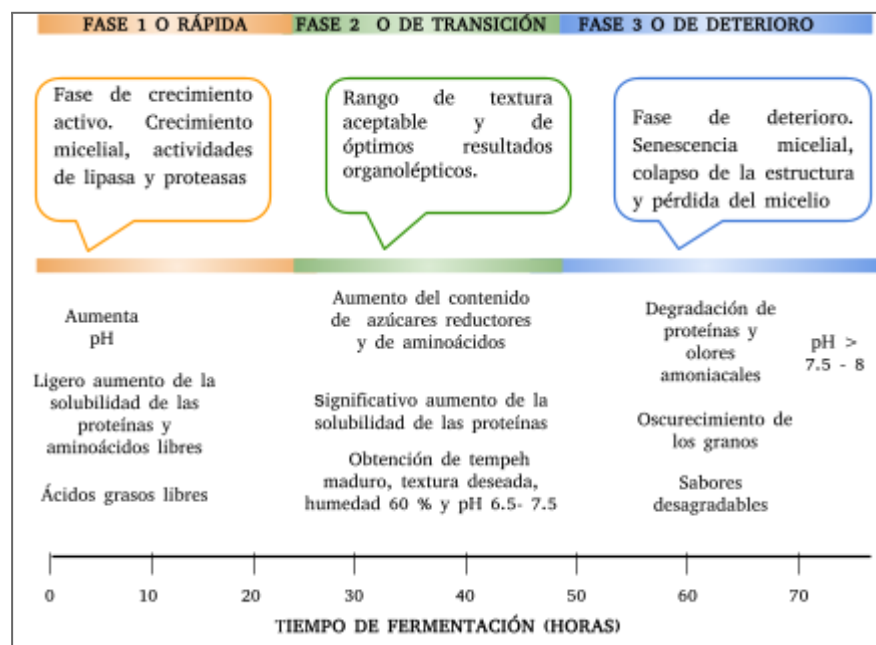


Figura 10. Fases durante la fermentación del tempeh

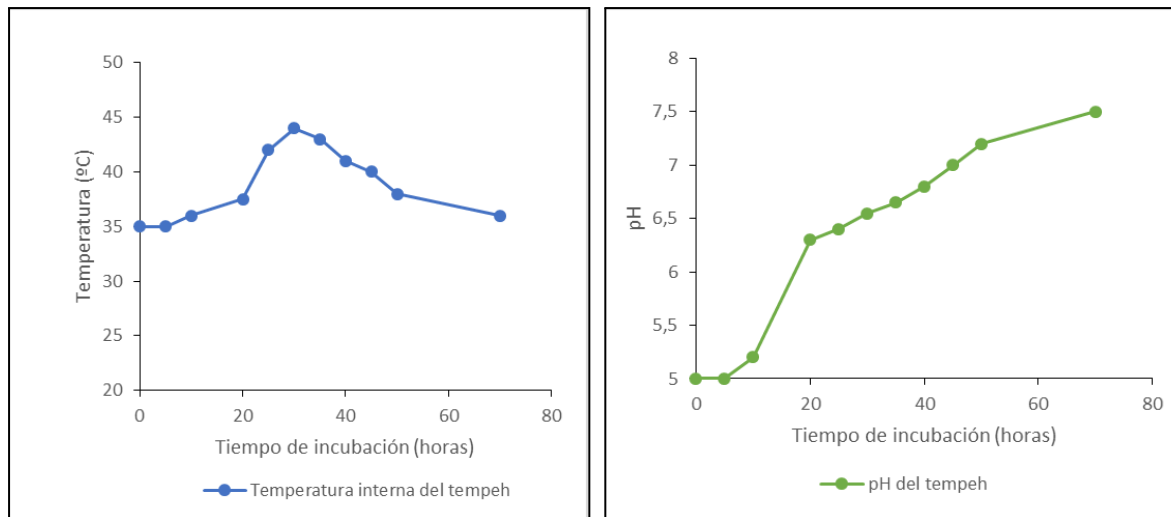


Figura 11. Cambios producidos durante la fermentación del tempeh (a la izquierda cambios en la temperatura interna del tempeh y (a la derecha) cambios en el pH del tempeh durante el proceso de fermentación. Datos extraídos del libro “The book of Tempeh” (William Shurtleff & Akiko Aoyagi, 2021).

Por último, durante la tercera fase o fase de deterioro se generan olores amoniacales y sabores desagradables, debido a la degradación de las proteínas, aumenta el pH (Sparringa & Owens, 1999c) por encima de 8.0, los granos se oscurecen, el hongo esporula y comienzan a predominar otros microorganismos en conjunto con el colapso de la estructura y pérdida del micelio (Handoyo & Morita, 2006). Cuando se pueden ver los granos a través del micelio húmedo, es probable que el hongo haya muerto.

Parámetros de calidad en el tempeh

Los criterios para un buen tempeh fueron definidos de acuerdo a la literatura, el libro “The Book of Tempeh” (William Shurtleff & Akiko Aoyagi, 2021) y la norma oficial registrada por la Comisión del CODEX Alimentarius (FAO/OMS, 2017), codificada como CODEX STAN 313R-2013 referente a textura, color, sabor y olor (ver Sección 2. tabla 1).

Criterios de selección

Los criterios de selección para la cepa de *Rhizopus oligosporus* fueron (i) fase *lag* ≤ 11 horas, (ii) < 20 horas en alcanzar $Y_{m\acute{a}x}$, (iii) micelio visible a las 24 horas, denso y de color blanco, limitando el grado de esporulación, (iv) pH final < 7 , (v) textura y resistencia del micelio al corte, la textura del tempeh debe ser compacta, no se debe desintegrar fácilmente

al cortarla con un cuchillo y todo el tempeh se puede levantar como un sola pieza cohesiva, (vi) sabor agradable, dulce, a hongo y aroma agradable fresco y sin olor a amoníaco.

Modelos de crecimiento microbiano

Diversos modelos no lineales han sido utilizados para describir el crecimiento microbiano. En un principio, los modelos se desarrollaron para predecir el crecimiento de bacterias (Baranyi y Roberts, 1994). No obstante, se han adecuado los modelos existentes para evaluar el crecimiento de hongos filamentosos, debido a la importancia de ellos, como vectores de contaminación de alimentos (García et al., 2009, Tremarin et al., 2015). Dantigny et al. (2007) y García et al. (2009) reportaron que existen tres tipos de modelos matemáticos (primarios, secundarios y terciarios) que pueden aplicarse para el análisis de hongos. García et al. (2009) y Tremarin et al. (2015) ajustaron los datos de crecimiento fúngico a la siguiente ecuación de Baranyi & Roberts:

$$\log_{10} N(t) = \log_{10} N(0) + \frac{\mu}{\ln(10)} \cdot A(t) - \frac{1}{\ln(10)} \cdot \ln \left\{ 1 + \frac{\exp[\mu \cdot A(t)] - 1}{10^{[\log_{10} N(\text{final}) - \log_{10} N(0)]}} \right\}$$

$N(t)$ = concentración de ADN fúngico a tiempo t (log/g)

$N(0)$ = concentración inicial de ADN fúngico (log/g)

μ = tasa máxima específica de crecimiento (min⁻¹)

$N(\text{final})$ = concentración final de ADN fúngico (log/g)

Donde $A(t)$:

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu} \cdot \ln[\exp(-\mu \cdot t) + \exp(-\mu \cdot \lambda) - \exp(-\mu \cdot t - \mu \cdot \lambda)]$$

λ = duración del período de retraso en el crecimiento o fase lag (min⁻¹)

Las curvas de crecimiento microbiano tienen una forma sigmoideal al igual que los modelos matemáticos utilizados para modelar el crecimiento, pudiéndose diferenciar en ellos las siguientes fases: (1) fase de retraso en el crecimiento o fase de latencia (fase lag o λ), (2) fase de aceleración, que se caracteriza por una tasa o velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) muy rápida y positiva llegando al máximo en el punto de inflexión de la curva, (3) fase estacionaria, en la que a partir del punto de inflexión la tasa de crecimiento comienza a disminuir, en la que se detiene el crecimiento o puede ser considerado como una mera reposición de tejidos (Parés-Casanova & Kucheroova 2014). Los modelos Logístico, de

Gompertz y de Von Bertalanffy son algunas de las funciones de crecimiento más frecuentemente utilizadas. El modelo Logístico se caracteriza usualmente por la forma sigmoideal. La ecuación de Gompertz es también sigmoideal, pero más flexible debido al punto de inflexión (Parés-Casanova & Kucherova 2014).

La principal diferencia entre estos modelos y el de Baranyi es que la fase media es realmente muy cercana a la linealidad y requiere de menos datos experimentales a diferencia de las curvas sigmoideas clásicas que tienen una curvatura más pronunciada allí y necesitan de un número mayor de datos (Parés-Casanova & Kucherova 2014).

5.2. OBJETIVO

Seleccionar la cepa con mayor capacidad de producir un tempeh elaborado a base de una mezcla de garbanzo, quinoa roja y semillas de girasol (GQGir) en una proporción de 50, 33 y 17 % respectivamente, a partir de cepas de *Rhizopus oligosporus* disponibles en la colección de cultivos del Laboratorio de Investigación Regional Norte (NRRL) del Servicio de Investigación Agrícola (ARS) del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA). Se pretende seleccionar una cepa de crecimiento rápido que sea capaz de producir tempeh de buena calidad en el menor tiempo posible.

Para ello se plantearon las siguientes actividades:

- Determinar las curvas de crecimiento de cada cepa de *Rhizopus oligosporus* durante la fermentación utilizando la mezcla GQGir como sustrato.
- Obtener los parámetros cinéticos: fase de latencia (λ o lag), tasa máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$), y concentración máxima ($Y_{m\acute{a}x}$).
- Evaluar la calidad del tempeh de acuerdo a las definiciones en la norma oficial CODEX STAN 313R-2013 y en el libro “The Book of Tempeh” (William Shurtleff & Akiko Aoyagi, 2021) sobre pH, aspecto del micelio y textura.

La cantidad de ADN fúngico desarrollado por cada cepa se evaluó mediante una qPCR puesta a punto y adaptada a la matriz de trabajo. Para obtener los parámetros de la cinética de crecimiento de cada cepa durante la fermentación de la mezcla de GQGir, las curvas de crecimiento de cada una de las cepas de *Rhizopus oligosporus* (expresado en Log/gramo de tempeh) fueron ajustadas usando el software DMFit 3.5 para Excel® que permite ajustar curvas experimentales de recuentos microbianos utilizando la ecuación de Baranyi & Roberts (1994). El software DMFit permite ajustar la función sigmoidea descrita por Baranyi & Roberts a los puntos experimentales y obtener los parámetros cinéticos principales (λ , $\mu_{m\acute{a}x}$ e $Y_{m\acute{a}x}$). Para los parámetros de calidad se determinará el pH, características del micelio mediante apreciación visual y descripción del aroma.

5.3. METODOLOGÍA

Preparación de esporas

Para la preparación de esporas se sembraron, con ansa estéril, 10 μ L de esporas de las cepas de *Rhizopus oligosporus* conservadas a -80 °C en tubos de agar inclinado, papa dextrosa agar (PDA- marca OXOID) y se llevaron a estufa a 28 °C hasta que la esporulación fue visible y la superficie adquirió un color oscuro como algodón negro, esto sucedió aproximadamente a los 7 días (Figura 12-A). Esto se realizó para las 8 cepas de *Rhizopus oligosporus*. La suspensión de esporas en agua, utilizada luego como inóculo para elaborar tempeh a partir de la mezcla GQGir, se elaboró mediante el agregado de agua destilada estéril al tubo inclinado de PDA esporulado, se agitó manualmente durante 1 minuto para facilitar el desprendimiento y suspensión en el agua de las esporas (Starzyńska-Janiszewska et al., 2019), se filtró con gasa estéril pasando el líquido a un tubo falcon 50 ml estéril para evitar el pasaje de restos de agar y micelio a la suspensión. Este paso se repitió hasta no observar visualmente esporas en el tubo ni en el agar. Los tubos falcon con las esporas en agua destilada se centrifugaron en un equipo Sigma 3-30K a 3000 rpm durante 10 minutos a 20 °C. Se descartó el sobrenadante y a los pellets obtenidos se les agregó 5 ml de una preparación de agua destilada estéril y Tween 80 (0,1% mL/L), se agitó durante unos segundos (Sparringa y Owens 2002, Starzyńska-Janiszewska et al., 2019) y se conservaron como stock a 4 °C (Figura 12-B) (ver Anexo C. 1). La utilización del Tween 80 protege y logra la homogeneización ideal de las esporas fúngicas en suspensión separándolas unas de otras permitiendo una mejor contabilización en cámara de Neubauer (Starzyńska-Janiszewska et al., 2019).

Determinación de la concentración de esporas

Para determinar la concentración de esporas (esporas en agua y tween 80) se usó un hemocitómetro o cámara de Neubauer, la cual permite realizar cuantificaciones de esporas en campos de dimensiones conocidas.

A partir de la suspensión de esporas de las cepas, se realizaron diluciones seriadas en base 10 en tubos de agua destilada estéril hasta la dilución -2 (Sparringa y Owens 2002). De la dilución a la -2 se tomaron 10 μ L con una micropipeta y se depositó en cada una de las área de conteo de la cámara, se dejó reposar 30 segundos, se llevó la cámara al microscopio y se contó a 40x. Se utilizó un microscopio binocular con cámara Euromex - BioBlue Digital modelo BB.4267. El proceso de cuantificación de esporas se realizó en las dos áreas de conteo de la cámara, se utilizó el promedio de los conteos y se calculó la concentración, según la siguiente ecuación:

$$\text{Esporas/ml} = \frac{N^{\circ} \text{ de esporas} \times \text{dilución} \times 10^4}{\text{mm}^2 \text{ contados}} = \frac{N^{\circ} \text{ de esporas} \times 1000 \times 10000}{5 \text{ mm}^2}$$

donde el *N° de esporas contadas* es el promedio de la sumatoria de los 5 cuadrantes contados (A+B+C+D+E) en ambas áreas de conteo y *dilución* es la dilución del tubo del cual se tomó la muestra, 10^4 es el factor de la cámara (volumen de cada cuadrante en el que se realiza el conteo de esporas) y mm^2 son los milímetros contados en total, cada cuadrante tiene un área de 1 mm^2 , se realiza el conteo en 5 cuadrantes por lo tanto es 5 mm^2 (Bustillo, 2010). La concentración de esporas de cada cepa se ajustó con agua destilada estéril hasta 1×10^4 esporas/mL para la producción de tempeh.

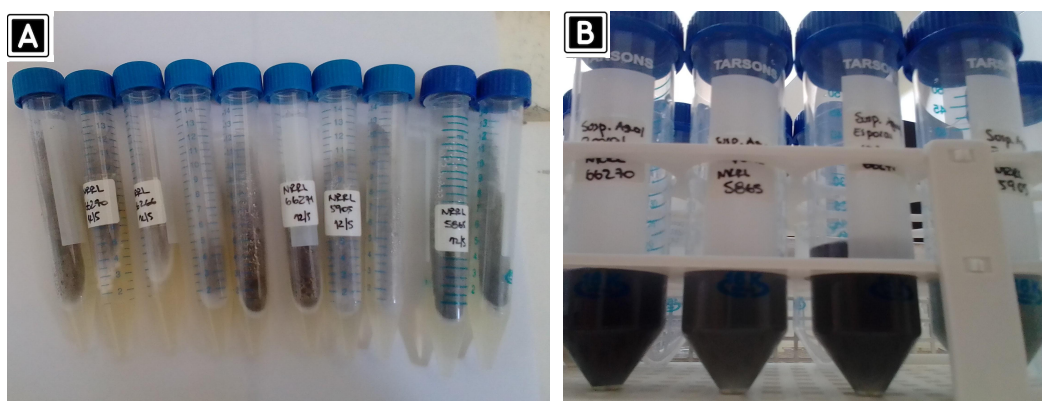


Figura 12. Esporas de *Rhizopus oligosporus* esporas cultivadas en tubos de agar inclinado de papa dextrosa a 28°C durante 7 días (A) y en suspensión (B).

Preparación de tempehs

Se elaboraron tempehs a base de una mezcla de garbanzo, quinoa roja y semillas de girasol con las siguientes cepas de *Rhizopus oligosporus* de la Colección de la NRRL 2549, 2710, 3271, 5865, 5905, 66266, 66270 y 66271. Los granos, legumbres y semillas se limpiaron y trataron de acuerdo con lo establecido en los estudios preliminares basados en los procesos tradicionales descritos por Nout & Kiers, 2005 y Ahnan-Winarno et al., 2021. La elaboración se realizó en una sala adecuada con mecheros y luz ultravioleta (UV-C) para trabajar en condiciones de esterilidad y la luz UV-C se aplicó antes y después de cada elaboración.

El garbanzo se partió y se dejó en remojo durante 8 horas. Luego, frotando el grano entre las palmas, se descartó la piel junto al agua de remojo. Se cocinó en agua hirviendo durante 30 minutos. La quinoa y las semillas de girasol no necesitan remojo y los tiempos de cocción fueron de 10 y 20 minutos respectivamente. En todos los casos el volumen de agua utilizado para la cocción fue equivalente a 3 veces el peso del grano. Luego se filtró para eliminar el

exceso de agua y los granos se esparcieron en una superficie plana y secaron en una estufa Memmert a 40 °C durante 20 minutos. Se retiraron de la estufa y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente. Luego se prepararon bolsas con la mezcla, una bolsa por cepa, en la proporción establecida de garbanzos (50 %), quinoa roja (33 %) y semillas de girasol (17 %). Para prevenir el crecimiento de los demás microorganismos y mantener el pH para el conveniente crecimiento de *Rhizopus oligosporus* (Reddy, Veena, & Savalgi, 2008), se acidifica con vinagre para ajustar el pH del sustrato quedando la mezcla lista para la inoculación. La cantidad de vinagre a adicionar fue de 0.02 mL/g de grano húmedo para llegar al valor de pH inicial de 4.5 - 5.5 adecuado para el crecimiento del hongo (Nout & Kiers, 2005).

Se inoculó cada mezcla preparada con una suspensión de esporas a una concentración de 1×10^4 esporas/g de grano húmedo de cada cepa de *Rhizopus oligosporus* (0.94 ml de NRRL 2549, 0.55 ml de NRRL 2710, 0.66 ml de NRRL 3271, 0.27 ml de NRRL 5865, 0.74 ml de NRRL 5905, 0.42 ml de NRRL 66266, 0.22 ml NRRL 66270 y 0.35 ml de NRRL 66271). Se agitó bien cada mezcla y se pesaron 60 g en bolsas de plástico del estilo ziplock perforadas para una circulación de aire lenta y homogénea para asegurar el desarrollo del micelio. Se prepararon dos tempehs por cepa (m1 y m2) para cada tiempo de análisis y duplicados de cada tiempo (0, 9, 12, 15, 20, 24 y 33 horas) (Figura 13).

Temperatura de fermentación y seguimiento de la temperatura interna del tempeh

La fermentación se realizó a 32 °C en una cámara de fermentación Thermo Scientific Heraeus GmbH D-63505. Se colocaron sondas de temperatura (TMC6-HC ONSET) conectadas a un HOBO Data Loggers (UX120-006M ONSET) en la cámara y en el interior de los tempehs para controlar la temperatura de la cámara y para seguir la evolución de la temperatura interna de la masa durante la fermentación respectivamente. Los datos se descargaron utilizando el software HOBOWare®.



Figura 13. Elaboración de tempehs de GQGir en el laboratorio de Alimentos y Nutrición del IPTP. Tempehs en cámara de fermentación (izquierda), micelio cohesivo (central) y micelio entre los intersticios de la torta del tempeh de garbanzo, quinoa roja y semillas de girasol.

Curvas de crecimiento de *Rhizopus oligosporus*. Determinación de ADN fúngico en el tempeh de GQGir

La determinación de ADN fúngico en los tempehs se realizó a tiempo 0, 9, 12, 15, 20, 24 y 33 horas de fermentación mediante qPCR. Para ello se liofilizaron los tempehs, se extrajo ADN y se determinó el ADN fúngico mediante la curva estándar de la qPCR diseñada y adaptada a la matriz de trabajo. Los valores de Ct de las curvas de qPCR de cada cepa fúngica en estudio se compararon con los valores de Ct de la curva estándar. Cada valor de Ct de la curva estándar corresponde a una concentración de ADN (ng de ADN fúngico/ μ L), determinando así la concentración de ADN fúngico inicial en los tempehs. Con los ng de ADN fúngico/ μ L cuantificados por la curva se calculó el valor correspondiente en gramos de tempeh, a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{ng ADN fúngico}}{\text{gramo de tempeh}} = \frac{\text{ADN } qPCR * \text{vol. extracción}_i * \left(\frac{\text{vol. suspensión muestra}}{\text{vol. extracción}_{ii}} \right)}{g \text{ de muestra}} = \frac{\text{ng}/\mu\text{L} * 100 \mu\text{L} * \left(\frac{30000 \mu\text{L}}{2000 \mu\text{L}} \right)}{3 g}$$

dónde, *ADN qPCR* son los ng de ADN fúngico por microlitro determinados por la curva de calibración de qPCR, *vol. extracción_i* es el volumen total de ADN obtenido con kit de extracción, *vol. suspensión muestra* es el volumen en que se suspendió la muestra de tempeh, *vol. extracción_{ii}* es el volumen que se toma para entrar al kit de extracción y *g de muestra* son los gramos de muestra inicial. Los valores se expresaron en Log de ADN fúngico por gramo de tempeh.

Ajuste de las curvas

Los datos de crecimiento de las cepas, es decir los valores de ADN fúngico expresados en log/g de tempeh, cuantificados por qPCR, para cada tiempo de análisis fueron ajustados mediante análisis de regresión no lineal correspondientes a la ecuación de Baranyi & Roberts (Baranyi & Robert 1994, Lobacz et al., 2020) usando el software DMFit 3.5 para obtener los parámetros cinéticos: $\mu_{m\acute{a}x}$, fase *lag*, e $Y_{m\acute{a}x}$. Un R^2 mayor al 70% es un indicativo de la calidad del ajuste del modelo a los datos y permite medir la proporción o porcentaje de variabilidad en los datos experimentales que es explicada por el modelo con una precisión aceptable. Otros autores recomiendan usar un R^2 ajustado (R^2_{aj}) de al menos un 70% en lugar de un R^2 , ya que este último aumenta de manera artificial con cada término que se agrega al modelo, aunque sea un término que no contribuye en mucho a la explicación de la respuesta, sin embargo, el R^2_{aj} baja de valor cuando el término que se agrega no aporta mucho a la explicación de la respuesta. Sin embargo, de acuerdo con Gan et al., 2007 y Mataragas et al., 2011, un valor de R^2 de al menos un 80% es considerado aceptable para los modelos predictivos en microbiología.

Determinación de pH en el tempeh de GQGir

El pH se determinó homogeneizando 5 gramos de tempeh en 20 ml de agua destilada, y luego se midió el pH con electrodo de pincho (Sparringa & Owens, 1999a). Las medidas se realizaron a tiempo 0, 9, 12, 15, 20, 24 y 33 horas de fermentación.

Aspecto visual y sensorial del tempeh de GQGir

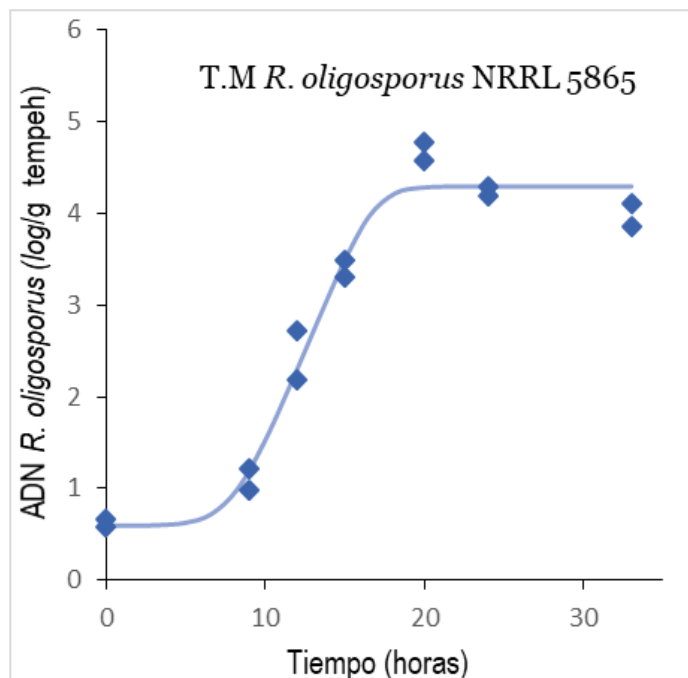
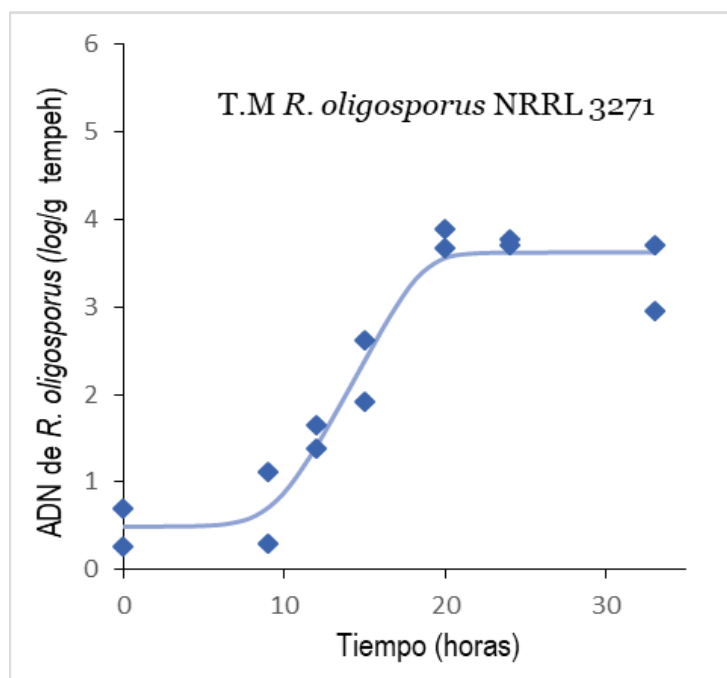
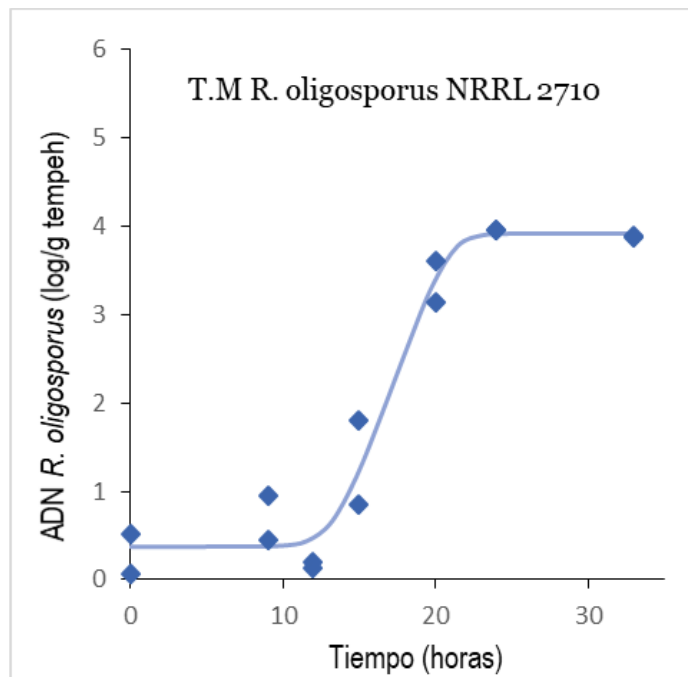
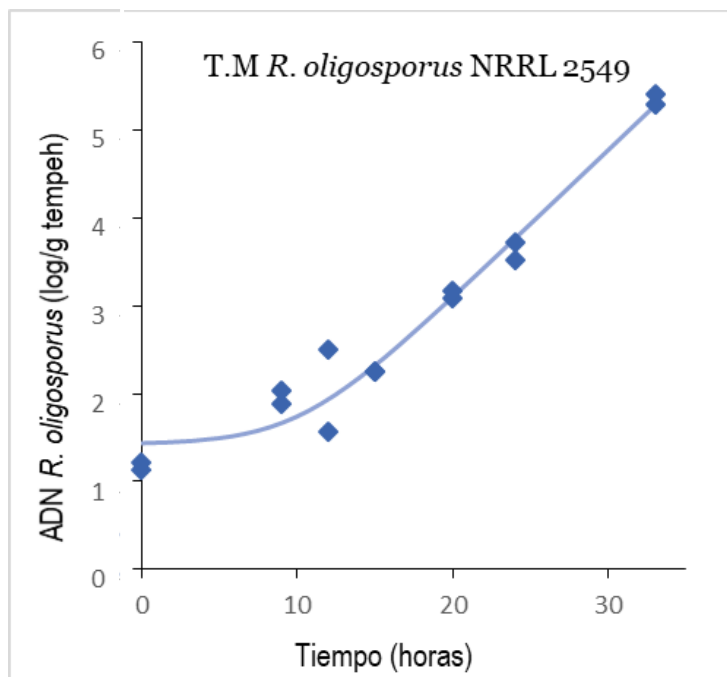
La apreciación visual y sensorial consistió en observar la capacidad de cada cepa de generar micelio sobre la mezcla GQGir. Se tuvo en cuenta (i) densidad del micelio, (ii) color, (iii) textura y resistencia del micelio al corte y (iv) aroma característico del tempeh.

El micelio es denso cuando cubre totalmente toda la superficie de los granos y no permite ver el límite entre ellos. El color debe ser blanco limitando el grado de esporulación natural del inóculo. La textura y resistencia del micelio al corte fue observada a partir del corte de una rebanada de 0.5 cm de espesor, definida como “compacta” cuando se mantiene sin desintegrarse y todo el tempeh se puede levantar como un sola pieza cohesiva y “blanda” cuando permite cortar pero no mantiene la forma al levantarlo. Para el aroma se consideraron aromas característicos del tempeh: agradable, fresco, a hongo, a tostado y sin olor a amoníaco.

5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curvas de crecimiento de *Rhizopus oligosporus* durante la fermentación del tempeh

Se observó aumento de ADN fúngico para todas las cepas ensayadas durante la fermentación en la matriz GQGir a 32°C durante 33 horas. Este crecimiento fúngico ocasionó, como era de esperar, un aumento en la temperatura interna del tempeh (ver Anexo B. Figura 20). Las curvas de crecimiento para cada cepa se muestran en la figura 14 y las determinaciones de ADN fúngico para cada cepa en la tabla 18 (ver Anexo A). Los datos en la tabla corresponden al valor promedio de los dos tempehs cuantificados (m1 y m2) para cada tiempo expresado en ng/g y en log/g de tempeh. Con respecto al crecimiento de las cepas durante el proceso de fermentación del tempeh se puede decir que los tempehs elaborados con las cepas fúngicas NRRL 2549, NRRL 2710 y NRRL 5865 el crecimiento fue estable entre las 20 y 24 horas y aumentó de 24 a 33 horas de fermentación según los valores de ADN fúngico/g. Para los tempehs elaborados con NRRL 3271 y NRRL 66266 hubo un aumento de crecimiento entre las 20 y las 24 horas y luego permaneció estable de 24 a 33 horas. Para NRRL 66270 y NRRL 66271 aumentó en el primer tramo y luego se observó un leve descenso de crecimiento en el segundo tramo. Y por último, NRRL 5905 en el primer tramo disminuyó y en el segundo se observó un aumento de crecimiento.



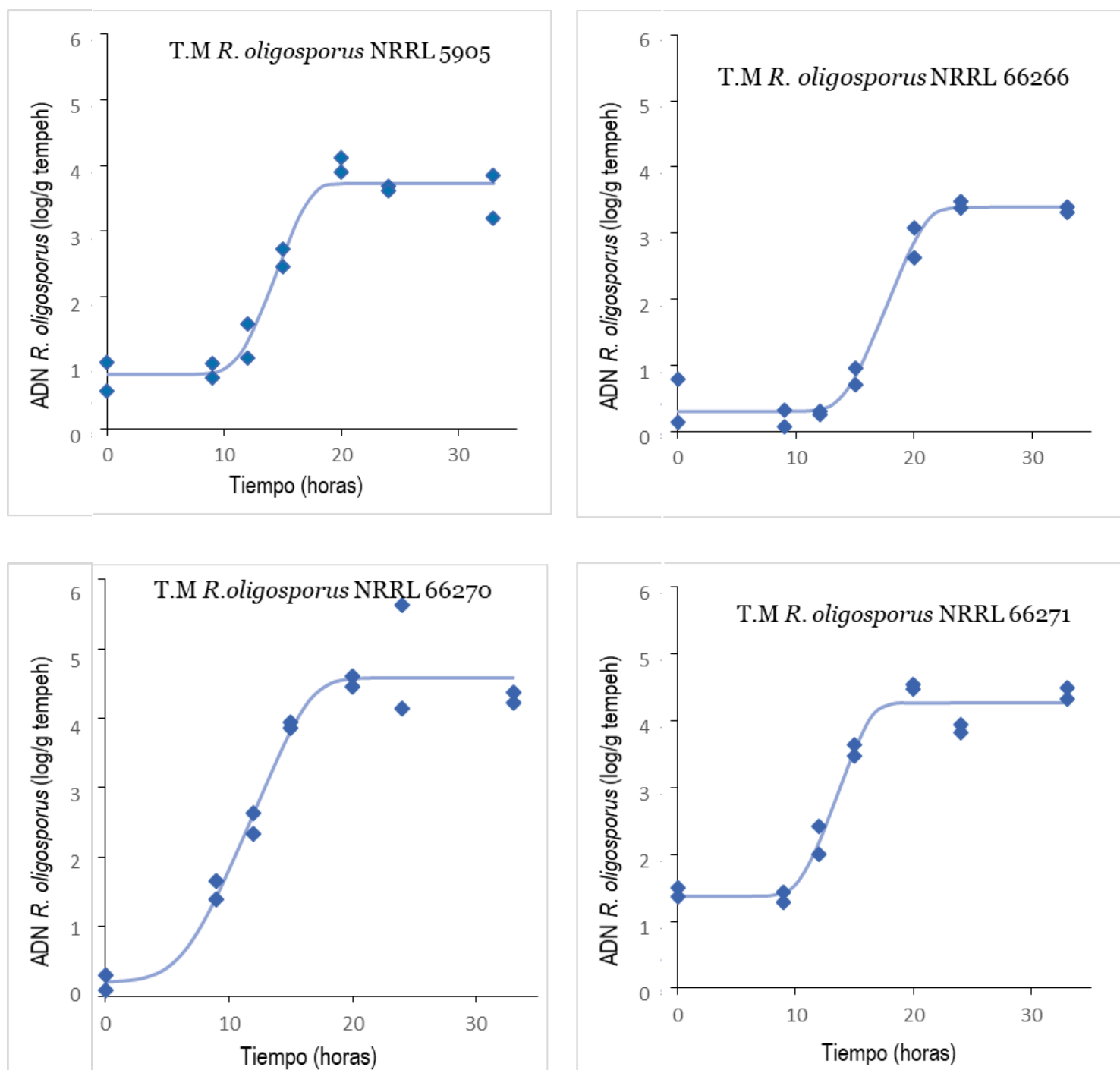


Figura 14. Curvas de crecimiento de cepas de *Rhizopus oligosporus* durante la fermentación de tempeh de garbanzo, quinoa roja y semillas de girasol ajustadas a la ecuación de Baranyi & Roberts utilizando el software DMFit. TM= tempeh de mezcla.

Los parámetros de crecimiento de cada cepa durante la fermentación se obtuvieron ajustando la ecuación de Baranyi & Roberts (Baranyi & Robert 1994, Lobacz et al., 2020), usando el software DMFit 3.5, a los datos de ADN fúngico expresados en log/g de tempeh obtenidos a distintos tiempos (0, 9, 12, 15, 20, 24 y 33 horas) durante la fermentación a 32°C. El R^2 del ajuste de las curvas de cada cepa para la mezcla GQGir varió entre 0.91 y 0.97 en todos los casos (tabla 3), sugiriendo un buen ajuste del modelo (Gan et al., 2007 y Mataragas et al., 2011). Los parámetros de crecimiento de cada cepa como fase *lag* (λ), $\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{\text{máx}}$ se muestran en la tabla 3.

Con respecto al crecimiento fúngico durante la producción de tempeh de GQGir, la cepa NRRL 2549 fue la de menor velocidad ($\mu_{\text{ámx}}$). Las cepas de crecimiento más rápido, expresado en log/g/hora, fueron las NRRL 66271 (0.48), NRRL 5905 (0.47), NRRL 2710 (0.46) y NRRL 66270 (0.43). En cuanto a la fase de latencia para el tempeh de GQGir variaron entre 14.08 y 6.31 horas. NRRL 66270 fue la cepa con la fase *lag* más corta. NRRL 66271 tuvo una fase *lag* de 10.36 horas, NRRL 5905 de 11.21 y NRRL 2710 de 13.27 horas. Las tasa de crecimiento es deseable que sea alta y que la fase *lag* sea corta dado que así se evita la contaminación por otros microorganismos y el posible deterioro del producto (Shurtleff, W., Aoyagi, A., 2021; Jennessen et al., 2008; Tahir et al., 2018).

La máxima cantidad de ADN fúngico expresada a través del parámetro $Y_{\text{máx}}$ en log/g de tempeh varió entre 3.39 y 5.40. Además de determinar la cantidad de ADN desarrollado por cada cepa se determinó el tiempo que cada cepa tarda en llegar a la máxima cantidad de micelio con el fin de seleccionar una cepa de crecimiento rápido y con menor tiempo de fermentación. El tiempo en llegar a su $Y_{\text{máx}}$ para cada cepa varió entre 17 (NRRL 66271) y 23 horas (NRRL 66266) (Tabla 3). Ese valor de tiempo para cada cepa se obtuvo a partir de las curvas de crecimiento de la Figura 14, observado como el punto correspondiente a la asíntota superior de la curva sigmoidea de la curva. Nuevamente la cepa NRRL 66271 parece una buena candidata de ser una cepa rápida, ya que no solamente tuvo la $\mu_{\text{máx}}$ más alta sino el tiempo más corto en llegar a su $Y_{\text{máx}}$.

Para los tempehs elaborados con la cepa NRRL 2549 si bien el modelo estimó una concentración final no se pudo sacar el tiempo de la curva de crecimiento en llegar al $Y_{\text{máx}}$ dado que la curva de crecimiento no fue sigmoide y al finalizar el estudio continuaba en fase lineal o exponencial, es decir continuaba en crecimiento.

Con estos resultados se observa que los parámetros del modelo de crecimiento fúngico por sí solos no permiten seleccionar una cepa ya que no siempre reflejan el aspecto del micelio en tempeh (como se verá más adelante en: Aspecto visual y sensorial del tempeh de GQGir). Por ejemplo, la cepa NRRL 2549 generó micelio muy poco denso a pesar de haber alcanzando el valor más alto de ADN fúngico ($Y_{\text{máx}}$) a las 33 horas de 5.40 log/g de tempeh. Además, el $Y_{\text{máx}}$ se alcanza al principio de la fase estacionaria y no cambia en el tiempo, parámetro que no refleja los cambios que sufre el micelio en ese periodo.

Tabla 3. Parámetros estimados de acuerdo a la ecuación de Baranyi & Roberts utilizando el software DMFit para el tempeh de GQGir elaborado a 32 °C con las cepas de *Rhizopus oligosporus*.

Cepa NRRL	$\mu_{m\acute{a}x}$ (log/g/h)	λ (horas)	$Y_{m\acute{a}x}$ (log/g)	Tiempo en llegar a $Y_{m\acute{a}x}$ (horas)	R ²	DE del ajuste del modelo
2549	0.17	10.19	5.40	sin dato	0.96	0.28
2710	0.46	13.27	3.92	22	0.96	0.26
3271	0.34	9.41	3.62	20	0.96	0.29
5865	0.41	7.89	4.29	19	0.97	0.29
5905	0.47	11.21	3.73	19	0.97	0.28
66266	0.44	14.08	3.39	23	0.97	0.22
66270	0.43	6.31	4.58	19	0.94	0.41
66271	0.48	10.36	4.27	17	0.96	0.25

$\mu_{m\acute{a}x}$ = tasa máxima de crecimiento, Fase *lag*= fase de latencia, $Y_{m\acute{a}x}$ = concentración final (o asíntota superior de la curva sigmoidea (o la asíntota inferior si la curva es decreciente).

DEt.: desviación estándar.

Evolución del pH durante la fermentación del tempeh de GQGir

Durante la fermentación se observaron cambios en el pH. Los valores iniciales de pH, para todos los tempehs, se encontraron en el rango entre 5.1 y 5.2 y los valores finales de pH, a las 33 horas de fermentación, entre 6.2 y 6.9. La evolución de los valores de pH durante la fermentación de tempeh de GQGir para cada cepa de *Rhizopus oligosporus* se muestran en la Figura 15 (ver Anexo A. Tabla 19.). Los valores de pH aumentan hasta el tiempo 20-24 horas y luego permanecen estables. Según la literatura un tempeh maduro con la textura deseada tiene un pH alrededor de 6.0-7.5 (Sparringa & Owens, 1999b) y podemos decir que éstos valores de pH para los tempehs se encuentran dentro de lo esperado.

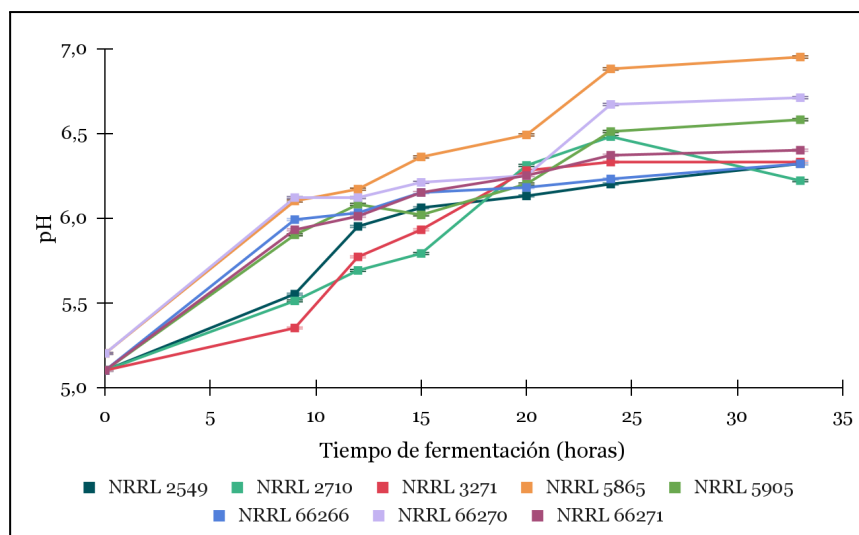


Figura 15. Evolución de los valores de pH durante la fermentación del tempeh de GQGir elaborados con diferentes cepas de *Rhizopus oligosporus*.

Aspecto visual y sensorial del tempeh de GQGir

De las 8 cepas que se probaron para la producción de tempeh, NRRL 2549 fue la única cepa que no generó micelio denso a las 33 horas de fermentación, el resto de las cepas NRRL 2710, 5865, 5905, 66270 y 66271 generaron micelio blanco, denso y uniforme a las 24 horas de fermentación y los tempehs elaborados con NRRL 2710 y 5865 presentaron pequeñas zonas grises (esporuladas). Estas 5 cepas (2710, 5865, 5905, 66270 y 66271) produjeron tempehs con micelio que atravesaba todo el ancho del tempeh y al cortar rebanadas de 0,5 cm de espesor, la textura era compacta y todo el tempeh se podía levantar como una sola pieza cohesiva. Sin embargo, los tempehs elaborados con las cepas NRRL 5905, 66270 y 66271 produjeron tempehs con estructura compacta y más firme que los elaborados con NRRL 2710 y NRRL 5865. Por el contrario los tempehs elaborados con las cepas NRRL 3271 y 66266 presentaron micelio menos denso y por consiguiente textura blanda (Figura 16).

A las 33 horas de fermentación (Figura 17), los tempehs mostraron desarrollo de micelio, aún más potente y totalmente blanco principalmente en los elaborados con las cepas NRRL 3271, 5905, 66270 y 66271. En los tempehs elaborados con NRRL 2710 y 5865 se observaron nuevamente zonas grises en la superficie y a éstos se sumaron los elaborados con NRRL 66266. Los tempehs elaborados con la cepa NRRL 2549 si bien no se observó micelio blanco y denso se apreció un comienzo de crecimiento de las hifas fúngicas que mantenían los granos juntos aunque ofrecía una débil resistencia al corte.

Con respecto a la textura y resistencia del micelio al corte a las 33 horas de fermentación los tempehs elaborados con las cepas de *Rhizopus oligosporus* NRRL 5905, 66270 y 66271

presentaron textura compacta y los elaborados con las cepas NRRL 2710, 3271, 5865, 66266 presentaron textura blanda.

También se apreció que todas los tempehs de GQGir presentaron aroma agradable y fresco. El aroma fue diferente entre las cepas, algunas cepas presentaron aroma a hongo (NRRL 2710 y NRRL 3271), otras a grano tostado (NRRL 66266, NRRL 5865, NRRL 5905 y NRRL 66270) y sólo una cepa aroma sutilmente dulce (NRRL 66271). Ninguna cepa produjo tempehs con olores desagradables como olor a amoníaco.



Figura 16. Micelio de tempeh a las 24 horas de fermentación Arriba, de izquierda a derecha: NRRL 2549, NRRL 2710, NRRL 3271, NRRL 5865. Abajo, de izquierda a derecha: NRRL 5905, NRRL 66266, NRRL 66270 y NRRL 66271.

Por lo tanto, cuando se considera el aspecto del tempeh, se observa que en general se obtuvieron tempehs de GQGir con buena generación de micelio, sin zonas grises esporuladas y con textura compacta a excepción de los tempehs obtenidos con las cepas NRRL 2710, NRRL 5865 y NRRL 66266. Al finalizar la fermentación los granos quedaron totalmente recubiertos por el micelio y el micelio atravesó varias capas de células de los granos (Sparringa & Owens, 1999a).

Las cepas que generaron tempeh de mejor calidad fueron NRRL 5905, NRRL 66270 y NRRL 66271. Estas cepas produjeron tempehs con buena generación de micelio (denso, blanco y uniforme), sin zonas esporuladas, con textura compacta que no se desintegraba fácilmente al cortarla con un cuchillo y todo el tempeh se podía levantar como una sola pieza cohesiva (CODEX STAN 313R-2013). Las cepas produjeron tempehs con aroma agradable, sin olor a amoníaco, aromas característicos en el tempeh pero diferentes entre las cepas. Por lo que se puede decir que las cepas de *Rhizopus oligosporus* se comportaron diferente en la misma matriz y en las mismas condiciones de fermentación.



Figura 17. Micelio de tempeh a las 33 horas de fermentación. Arriba de izquierda a derecha: NRRL 2549, NRRL 2710, NRRL 3271, NRRL 5865. Abajo, de izquierda a derecha: NRRL 5905, NRRL 66266, NRRL 66270 y NRRL 66271.

Considerando los parámetros cinéticos y el aspecto visual y sensorial se establecieron los siguientes criterios de selección: (i) fase *lag* $\leq$ 11 horas, (ii) $<$ 20 horas en alcanzar $Y_{m\acute{a}x}$, (iii) micelio visible a las 24 horas, denso y de color blanco, limitando el grado de esporulación, (iv) pH final $<$ 7, (v) textura y resistencia del micelio al corte, la textura del tempeh debe ser compacta, no se debe desintegrar fácilmente al cortarla con un cuchillo y todo el tempeh se puede levantar como una sola pieza cohesiva, (vi) aroma agradable fresco y sin olor a amoníaco. En base a los criterios establecidos se seleccionaron las cepas NRRL 5905, NRRL 66270 y NRRL 66271 para la producción de tempeh de GQGir.

Para definir una única cepa de *Rhizopus oligosporus* como la de mayor capacidad de producir tempeh de GQGir se elaboraron tempehs con las tres cepas seleccionadas se cocinaron en sartén unos minutos de cada lado hasta dorar, ya que el tempeh no se consume crudo. La cepa seleccionada fue la NRRL 66271 que produjo tempehs con sabor y aroma agradable, fresco, a grano tostado y sutilmente dulce, ésta última característica la diferenció de las otras dos cepas.

5.5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

La fermentación del tempeh a 32 °C elaborado con las diferentes cepas de *Rhizopus oligosporus* estudiadas transcurrió de acuerdo a lo descrito en literatura consultada. Durante las primeras horas de fermentación se observó un aumento de la temperatura interna hasta casi alcanzar la temperatura de la cámara manteniéndose constante hasta las 15-20 horas que las temperaturas internas de los tempehs sobrepasaron la temperatura de la cámara producto del metabolismo fúngico. En este sentido NRRL 66271 se destacó entre las cepas de estudio como aquella cepa que inició primero el aumento de temperatura (15.15 horas) y NRRL 2549 que lo hizo en último lugar (17.35 horas).

Se observó, mediante qPCR, aumento de ADN fúngico para todas las cepas ensayadas durante la fermentación en la matriz GQGir durante 33 horas. Al analizar lo que sucede entre las 20, 24 y 33 horas de fermentación a 32 °C las cepas se comportaron diferente, visualizando las diferencias en el crecimiento entre las cepas. Por un lado, la cepa NRRL 2549 fue la de menor velocidad ($\mu_{\text{ámx}}$). Por otro lado, las cepas de crecimiento más rápido fueron las NRRL 66271, NRRL 5905 y NRRL 2710. Al ver los datos de la tasa de velocidad de crecimiento NRRL 66271 obtuvo el valor más alto (0,48 ADN fúngico expresado en log/g de tempeh/hora) y NRRL 2549 el valor más bajo (0.17 ADN fúngico expresado en log/g de tempeh/hora). Esto marca diferencias de crecimiento entre las cepas estudiadas identificando algunas cepas que se desarrollan más rápido que otras.

Se observó que los parámetros del modelo de crecimiento fúngico por sí solos no permiten seleccionar una cepa ya que no siempre reflejan el aspecto del micelio en tempeh. El $Y_{\text{máx}}$ se alcanza al principio de la fase estacionaria y no cambia en el tiempo, parámetro que no refleja los cambios que sufre el micelio en ese periodo. Cuando se considera el aspecto del tempeh, se observa que en general se obtuvieron tempehs de GQGir con buena generación de micelio (denso, blanco y uniforme), sin zonas grises esporuladas y con textura compacta a excepción de los tempehs obtenidos con las cepas NRRL 2710, NRRL 5865 y NRRL 66266. NRRL 5905, NRRL 66270 y NRRL 66271 produjeron tempehs con buena generación de micelio, blanco y denso sin esporular, produjeron tempehs con mayor firmeza que el resto de las cepas y con aroma agradable. La cepa seleccionada fue la NRRL 66271 que produjo tempehs con sabor y aroma agradable, fresco, a grano tostado y sutilmente dulce, ésta última característica la diferenció de las otras dos cepas.

Las cepas de *Rhizopus oligosporus* utilizadas para la elaboración de tempeh producen tempehs con características sensoriales diferentes, obteniendo productos únicos con cada una de las cepas dado que son productoras de compuestos aromáticos diferentes, mejoran las características sensoriales en el tempeh y permiten una diferenciación sensorial frente a otros productos similares que se encuentran en el mercado.

La diversidad observada entre las cepas de *Rhizopus oligosporus* estudiadas remarca la importancia de la selección.

6. CAPÍTULO 3

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE TEMPEH DE GARBANZO, QUINOA ROJA Y SEMILLAS DE GIRASOL

6.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se describe la optimización de las variables más influyentes del proceso de fermentación del tempeh como (i) nivel de inóculo, (ii) temperatura de fermentación y (iii) tiempo de fermentación. Para el estudio del efecto de las variables y sus interacciones sobre el proceso de elaboración se utilizó la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM), con un Diseño Central Compuesto, y el software estadístico Design-Expert® Versión 13 (Myers et al., 2004, Zimet et al., 2018, Martinez-Silveira et al., 2019). Las variables de respuesta (en adelante, respuestas) fueron: desarrollo fúngico, pH y humedad. Para la optimización se seleccionó la combinación de las variables para las cuales los valores de las respuestas se encontraron en los rangos definidos para un tempeh maduro, como desarrollo de micelio máximo, pH entre 6.0 y 7.0 y humedad máxima de 65 % (CODEX STAN 313R-2013, William Shurtleff & Akiko Aoyagi, 2021).

Como se describió en la sección 5.1 del capítulo 2: “Condiciones de fermentación del tempeh” y “Etapas de la fermentación” los cambios producidos en el tempeh durante la fermentación dependen del nivel de inóculo utilizado, de la temperatura y del tiempo de fermentación. El tiempo está condicionado por la temperatura de la cámara de fermentación utilizada en el proceso ya que el crecimiento de *Rhizopus oligosporus* depende de la temperatura de fermentación (Tahir et al., 2018). El nivel de inoculación también afecta el desarrollo de la fermentación. En general se inocula en una relación de 1×10^4 esporas por gramo de sustrato húmedo. Bajos niveles de inoculación ($\leq 1 \times 10^2$) tiene como consecuencia la falta de homogeneidad en el desarrollo del micelio, mayores periodos de fermentación y altas posibilidades de descomposición bacteriana. En cambio, altos niveles de inoculación ($>1 \times 10^8$ esporas/gramo) provocan una fermentación excesiva con un aumento de la temperatura interna en el tempeh que conduce a la muerte prematura del hongo. Por lo tanto las variables a optimizar son de gran importancia para permitir un adecuado desarrollo fúngico y obtener un tempeh de buena calidad nutricional y sensorial.

Por otro lado, las variables (i) nivel de inóculo y (ii) tiempo de fermentación son componentes importantes en el costo de producción de la elaboración de tempeh, por lo tanto optimizar dichas variables podría contribuir a reducir los costos finales de la misma.

6.2. OBJETIVO

Seleccionar el nivel de inóculo, la temperatura y el tiempo para optimizar el proceso de fermentación en estado sólido del tempeh de garbanzo, quinoa roja y semillas de girasol elaborado con la cepa de *Rhizopus oligosporus* NRRL 66271.

6.3. METODOLOGÍA

Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental central compuesto de tres factores (variables independientes), dos niveles con seis puntos centrales, utilizando el software Desing-Expert® (Versión 13, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, E.E.U.U.). Los niveles de los factores variaron para el inóculo entre 2 y 6 log esporas/g de grano húmedo de la cepa de *Rhizopus oligosporus* NRRL 66271, para la temperatura de fermentación entre 30 y 34 °C y para el tiempo de fermentación entre 18 y 35 horas. Las respuestas (variables dependientes) estudiadas fueron (i) desarrollo de micelio por qPCR expresado como ADN fúngico ng/g de tempeh alcanzado en cada condición, (ii) pH y (iii) porcentaje de humedad. La matriz de diseño consistió en 20 corridas con las diferentes combinaciones de las variables y se presenta en la Tabla 4.

Preparación y análisis de los tempehs

Los tempehs se prepararon de acuerdo con la matriz de diseño siguiendo el proceso descrito en la sección 5.3 del capítulo 2 “Preparación de tempehs”. Se elaboraron tempehs por duplicado y se analizaron en los tiempos estipulados en el diseño (tabla 4). Uno de los tempehs se liofilizó para la determinación de ADN fúngico/g de tempeh mediante qPCR y el otro se analizó en fresco para determinar pH, humedad y apreciación visual y sensorial. Para la determinación de ADN fúngico/g, pH y apreciación visual y sensorial en el tempeh se siguieron los procedimientos descritos en la sección 5.3 del capítulo 2 “Curvas de crecimiento de *Rhizopus oligosporus*: Determinación de ADN fúngico en el tempeh de GQGir”, “Determinación de pH en el tempeh de GQGir” y “Aspecto visual y sensorial del tempeh de GQGir” respectivamente. La determinación del porcentaje de humedad en el tempeh se realizó por el método de secado en termobalanza, utilizando el equipo Sartorius MA-35. La temperatura de secado fue de 60 °C y la muestra se secó hasta peso constante, partiendo de 10 g de muestra de tempeh previamente molida en un mortero para contar con una muestra homogénea.

Análisis de datos

Los datos experimentales del diseño se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de la variabilidad de las variables de respuesta y elegir el mejor modelo y sin falta de ajuste. Se ajustaron las respuestas observadas a modelos de primer orden, segundo orden y cuadráticos. Los modelos fueron seleccionados mediante el Método

de Suma Secuencial de Cuadrados y evaluados en función de los coeficientes estadísticamente significativos y los valores de R^2 utilizando la técnica ANOVA, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. La potencia del modelo estimada a partir de la relación entre señal-ruido revela la fracción de la región de diseño que puede predecir la respuesta con suficiente precisión y debería ser al menos del 80% (Gan et al., 2007). La diferencia entre los valores de R^2 predicho y el R^2 ajustado refleja el error de predicción del modelo y un error de hasta 20 % (< 0.2) se considera aceptable, indicando un ajuste confiable del modelo (Gan et al., 2007). La relación señal-ruido medida por el término “precisión adecuada” es deseable que sea mayor que 4.

La RSM incluyó la generación de superficies de respuesta en 3D y gráficos de contorno para estudiar las relaciones e interacciones generales entre las variables y las respuestas.

Optimización del proceso de fermentación del tempeh de GQGir

Los criterios para la optimización del proceso de fermentación del tempeh de GQGir fueron minimizar el nivel de inóculo entre 3 - 6 log/g, minimizar el tiempo de fermentación en el rango (27-30 horas), temperatura de fermentación en el rango (30-34 °C), maximizar ADN fúngico (3.42×10^2 y 1.04×10^5 ng/g de tempeh), pH entre 6.0 y 7.0 y humedad en el rango (66 y 70 %). En los criterios definidos se contemplan parámetros sensoriales adecuados para un buen tempeh, como micelio algodonoso, denso y de color blanco limitando el grado de esporulación, textura compacta y resistencia al corte y aroma agradable, fresco, característico del tempeh (Norma CODEX STAN 313R-2013, William Shurtleff & Akiko Aoyagi, 2021).

6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ADN fúngico, pH y humedad del tempeh de GQGir

Los resultados obtenidos para las respuestas ADN fúngico ng/g, pH y humedad en el tempeh en cada corrida experimental se muestran en la tabla 4.

El ADN fúngico varió entre 3.42×10^2 y 9.30×10^4 ng/g de tempeh. El valor mínimo se observó para la corrida con inóculo bajo (2 log/g) y tiempo de fermentación de 18 horas. El valor máximo se observó en la corrida con inóculo más alto (7.3 log/g) y tiempo de fermentación de 26.5 horas. Se observó en general que a medida que aumenta el inóculo aumenta la respuesta ADN fúngico/g. Esto se contempla comparando las corridas de inóculo bajo y alto a tiempos de 18 horas y sucede lo mismo, a tiempos de fermentación mayores, a 35 horas. Se observa la misma relación con la temperatura de fermentación, a mayor temperatura mayor ADN fúngico/g en los tempehs. Esto se aprecia comparando las corridas, a iguales condiciones de inóculo y tiempo, a 30 °C y 34 °C.

Tabla 4. Matriz de diseño: variables y respuestas utilizadas en el diseño factorial en el tempeh de GQGir.

Corrida	Nivel de inóculo (log/g)	Temperatura de fermentación (°C)	Tiempo de fermentación (horas)	ADN fúngico (ng/g)	pH	Humedad (%)
1	4	28.6	26.5	4.62x10 ⁴	6.1	80.5
2	2	30	18	3.42x10 ²	6.0	95.0
3	6	30	18	5.70x10 ⁴	6.5	86.1
4	2	30	35	4.25x10 ⁴	5.7	77.7
5	6	30	35	5.28x10 ⁴	6.0	66.9
6	4	32	12.2	4.50x10 ³	5.7	91.2
7	4	32	26.5	6.78x10 ⁴	6.1	69.5
8	4	32	26.5	8.25x10 ⁴	6.0	64.3
9	4	32	26.5	6.95x10 ⁴	6.1	65.0
10	4	32	26.5	5.65x10 ⁴	6.3	67.4
11	4	32	26.5	6.85x10 ⁴	6.1	62.6
12	4	32	26.5	7.90x10 ⁴	6.3	64.9
13	4	32	40.7	7.50x10 ⁴	6.7	62.8
14	0.6	32	26.5	4.17x10 ⁴	6.3	96.5
15	7.3	32	26.5	9.30x10 ⁴	6.5	68.6
16	2	34	18	2.12x10 ³	5.9	71.9
17	6	34	18	6.00x10 ⁴	6.0	78.1
18	2	34	35	1.04x10 ⁴	5.8	75.8
19	6	34	35	7.14x10 ⁴	6.3	68.5
20	4	35.3	26,5	5.43x10 ⁴	6.1	68.2

Los valores de pH, para todas los tempehs se encontraron en el rango entre 5.7 y 6.7 (Tabla 4). Estos valores corresponden a los extremos de tiempo del diseño, de 12.2 y 40.7 horas de fermentación respectivamente. Todos los valores se encontraron dentro de lo esperado para un tempeh maduro según la literatura (Sparringa & Owens, 1999b) y no variaron significativamente en el escenario estudiado.

Con respecto a la humedad, los valores variaron desde 62.6 a 96.5 % (Tabla 4). Se observa que el porcentaje de humedad baja a medida que aumenta el tiempo de fermentación y aumenta el nivel de inóculo, esto se observa en los tempehs fermentados a 30 °C, los valores de humedad en las combinaciones 30-18-2, 30-18-6, 30-35-2 y 30-35-6, donde el primer número corresponde a la temperatura de fermentación (°C), el segundo al tiempo de fermentación (en horas) y el tercero al nivel de inóculo (en log/g), fueron 95.0, 86.1, 77.7 y 66.9 % respectivamente. Se observa la misma relación con la temperatura de

fermentación, esto lo vemos al comparar los mismos tempehs (mismo tiempo de fermentación y nivel de inóculo) a 34 °C y al comparar los tempehs sometidos a las temperaturas extremas del diseño a 28.6 °C (80.5 %) y a 35.3 °C (68.2 %). Esta relación inversa entre el tiempo de fermentación y la humedad también se apreció en los tempehs con 12.2 (91.2 %) y 40.7 (62.8 %) horas de fermentación. La variable nivel de inóculo muestra el mismo comportamiento, a mayor inóculo de 0.6 (96.5 %) a 7.3 (68.6 %) menor % de humedad en los tempehs. En los puntos centrales los valores de humedad variaron entre 62.6 y 69.5 %. Existe una relación inversa entre las variables estudiadas en la matriz de diseño y la respuesta humedad. Cuando la variable aumenta, sea la temperatura de fermentación, el tiempo de fermentación o nivel de inóculo, el valor de la respuesta (humedad) disminuye (figura 19-A, 20-B y 20-C).

Modelado del efecto del nivel de inóculo, de la temperatura de fermentación y el tiempo sobre la respuesta desarrollo fúngico, humedad y pH en el tempeh GQGir mediante RSM

Las respuestas del diseño fueron analizadas con el software estadístico Desing-Expert® obteniendo las ecuaciones de los modelos que las vinculan con el nivel de inóculo, la temperatura de fermentación y el tiempo de fermentación.

La respuesta desarrollo fúngico expresada como ADN fúngico/g se ajustó a un modelo cuadrático con una significancia de $p < 0.0001$ y un R^2 de 0.9359, lo que explica un 93.59 % de la variabilidad de la respuesta. La diferencia entre los valores R^2 predicho (0.6606) y R^2 ajustado (0.8782) es cercana a 0.2 y la relación señal-ruido resultante, medida por el término “precisión adecuada” (> 4), indicó que el modelo podría usarse para navegar por el espacio de diseño (Tabla 5). El modelo cuadrático no presentó falta de ajuste ($F = 1.29$ y $p = 0.3943$).

La respuesta humedad se ajustó a un modelo cuadrático con una significancia de $p < 0.0001$ y un valor R^2 0.9189, lo que explica un 91.89 % de la variabilidad de la respuesta. La diferencia entre los valores R^2 predicho (0.7237) y R^2 ajustado (0.8815) es la esperada (< 0.2). La precisión adecuada fue > 4 indicando nuevamente que el modelo podría usarse para navegar por el espacio de diseño (Tabla 5) a pesar de presentar falta de ajuste ($F = 8.84$ y $p = 0.0140$).

El pH no varió significativamente, en el rango utilizado en este estudio las variables no son significativas y por lo tanto no se ajustó a ningún modelo.

Tabla 5. Resumen del análisis de regresión de las respuestas ADN fúngico/g y humedad en el tempeh GQGir elaborado con la cepa NRRL 66271.

Respuesta	Modelo	Significancia	R ²	R ² ajustado	R ² predicho	Precisión adecuada
ADN fúngico	cuadrático	0.0001	0.9359	0.8782	0.6606	14.1454
Humedad	cuadrático	0.0001	0.9189	0.8815	0.7237	13.3902

Los resultados del ANOVA para la respuesta ADN fúngico indicó que tanto la temperatura de fermentación ($p = 0.0220$), tiempo de fermentación ($p= 0.0001$), nivel de inóculo ($p= 0.0006$) y las interacciones temperatura-tiempo ($p= 0.0221$) y tiempo-inóculo ($p= 0.0006$) fueron significativas, donde la temperatura tuvo mayor impacto frente al resto de los factores y sus interacciones y tiempo-inóculo fue la única interacción significativa que afectó negativamente en la respuesta con un 95 % de confianza. Y para la respuesta humedad tanto el tiempo de fermentación ($p= 0.0001$), el nivel de inóculo ($p= 0.0001$), y sus factores al cuadrado ($p=0.0001$) fueron significativos con un 95 % de confianza, donde el tiempo tuvo mayor impacto en la humedad que el nivel de inóculo.

Las ecuaciones generadas para cada respuesta, incluyendo sólo los términos con significancia estadística ($p < 0.05$), fueron los siguientes:

$$\text{ADN fúngico (ng/g)} = - 2.03679\text{E}+06 + 1.18074\text{E}+05 \times \text{temperatura} - 2992.89213 \times \text{tiempo} + 78165.05654 \times \text{inóculo} + 554.57353 \times \text{temperatura} \times \text{tiempo} - 1299.31250 \times \text{temperatura} \times \text{inóculo} - 1005.42647 \times \text{tiempo} \times \text{inóculo} - 1936.92855 \times \text{temperatura}^2 - 158.61626 \times \text{tiempo}^2 - 425.48780 \times \text{inóculo}^2$$

$$\text{Humedad (\%)} = + 333.48036 - 4.82942 \times \text{temperatura} - 10.22481 \times \text{tiempo} + 15.94964 \times \text{inóculo} + 0.163382 \times \text{temperatura} \times \text{tiempo} + 0.08009 \times \text{tiempo}^2 + 1.64467 \times \text{inóculo}^2$$

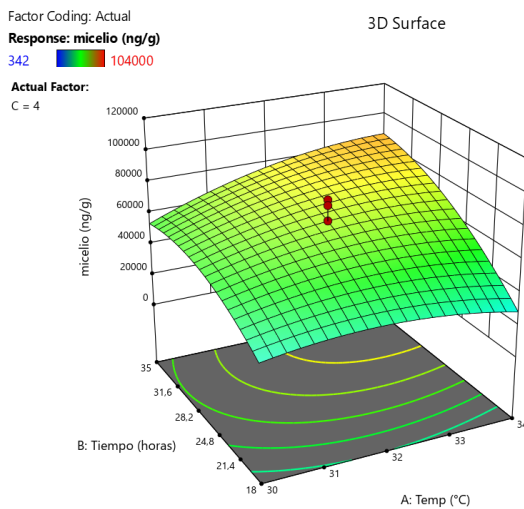
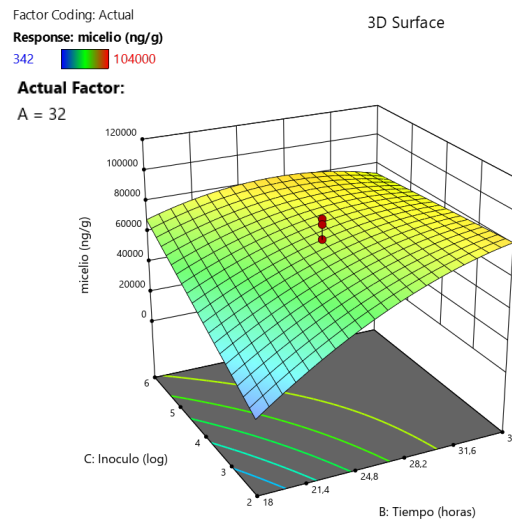
A**B**

Figura 18. Superficie de respuesta generada del diseño central compuesto donde se visualiza (A) el efecto de la interacción de las variables tiempo de fermentación (horas) y temperatura de fermentación (°C), a nivel de inóculo medio (4 log), sobre el desarrollo fúngico de *Rhizopus oligosporus* en tempeh GQGir (ng de ADN fúngico/g de tempeh) y (B) el efecto de la interacción de las variables nivel de inóculo (log/g) y tiempo de fermentación (horas), a temperatura de fermentación de 32 °C, sobre el desarrollo fúngico de *Rhizopus oligosporus* en el tempeh GQGir (ng de ADN fúngico/g de tempeh).

En la figura 18 se muestran los gráficos de las superficies de respuesta donde se visualiza el efecto del tiempo y la temperatura de fermentación en el desarrollo fúngico de la cepa NRRL 66271 en la elaboración de tempeh GQGir y cómo a medida que aumenta el tiempo y la temperatura de fermentación aumenta la cantidad de ADN fúngico por gramo de tempeh teniendo mayor impacto en la variable de respuesta la temperatura de fermentación (figura 18-A). Esto se corresponde con lo encontrado en la literatura, donde la temperatura y el tiempo son factores de relevancia en el desarrollo del hongo (Nout & Kiers, 2005, Tahir et al., 2018).

El efecto del nivel de inóculo y el tiempo de fermentación en el desarrollo fúngico de la cepa NRRL 66271 se observa en la figura 18-B donde a medida que aumenta el nivel de inóculo y el tiempo de fermentación el ADN fúngico aumenta hasta alcanzar su máximo.

En las figuras 19-A 19-B y 19-C se visualiza el efecto del tiempo y de la temperatura de fermentación, a nivel de inóculo bajo de 2 log (figura 19-A), medio de 4 log (figura 19-B) y alto de 6 log (figura 19-C), en la humedad del tempeh donde a tiempos mayores de fermentación la humedad disminuye en los tempehs y lo mismo se aprecia con la temperatura, a medida que ésta aumenta la humedad en los tempehs es menor. Encontrándose el valor de humedad óptimo en los puntos centrales del diseño, a nivel de inóculo de 4 log, tiempo de fermentación de 26.5 horas y temperatura de fermentación de 32 °C (Figura 19-B).

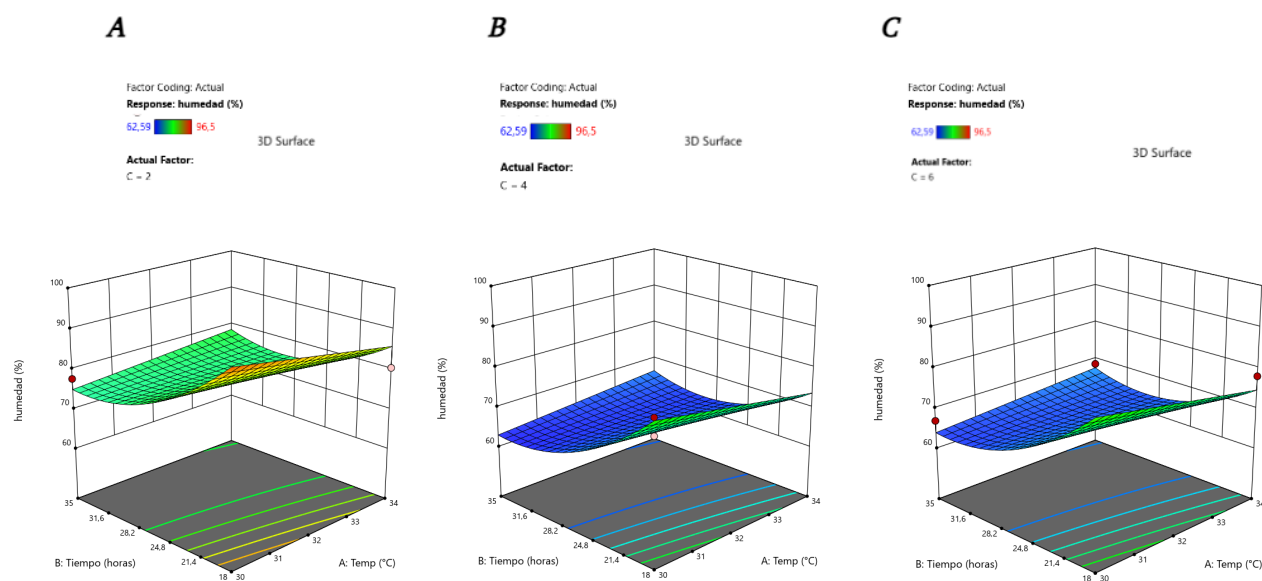


Figura 19. Superficie de respuesta generada del diseño central compuesto donde se visualiza el efecto del tiempo de fermentación (horas) y de la temperatura de fermentación (°C) en la humedad (%) del tempeh GQGir en (A) a nivel de inóculo bajo (2 log), en (B) a nivel de inóculo medio (4 log) y en (C) a nivel de inóculo alto (6 log).

Apreciación visual y sensorial del tempeh de GQGir

Las características más importantes de la apreciación visual y sensorial de los tempehs obtenidos con el diseño experimental se describen en la tabla 6. Con respecto al aspecto del micelio, se observó formación de micelio “visible”, color, grado de esporulación (presencia de zonas grises sobre el micelio) y la densidad (el micelio es denso o muy denso cuando cubre totalmente los granos y sin cortarlo no se diferencian los granos). De la textura, se definió como “compacta” cuando al cortarla con un cuchillo no desintegra fácilmente y todo el tempeh se puede levantar como un sola pieza cohesiva y “sin textura” cuando los granos se encontraban sueltos y “blanda” permitía cortar pero no mantener la forma y del aroma se categorizó en “agradable”, “fresco”, y dentro del aroma característico del tempeh, “a tempeh” cuando es un aroma intenso, “a hongo”, “dulce”, “picante”, entre otros.

Los parámetros sensoriales que se consideraron referidos al aspecto del micelio, textura y resistencia al corte y aroma son los definidos para un buen tempeh en el libro “The Book of Tempeh” (William Shurtleff & Akiko Aoyagi, 2021) y en la norma oficial registrada por la Comisión del CODEX Alimentarius (FAO/OMS, 2017), codificada como CODEX STAN 313R-2013.

Tabla 6. Aspecto del micelio, textura y aroma del tempeh mediante el diseño experimental

Corrida	Nivel de inóculo (log/g)	Temperatura de fermentación (°C)	Tiempo de fermentación (horas)	Aspecto del micelio	Textura	Aroma
1	4	28.6	26.5	no visible	blanda	
2	2	30	18	no visible	sin textura	
3	6	30	18	visible, poco denso	blanda	agradable, dulce, suave a tempeh
4	2	30	35	blanco, poco denso	compacta	agradable, dulce y a tempeh
5	6	30	35	blanco y denso	compacta	hongo
6	4	32	12.2	no visible	sin textura	
7	4	32	26.5	blanco y muy denso	compacta	dulce y a tempeh
8	4	32	26.5	blanco y muy denso	compacta	dulce y a tempeh
9	4	32	26.5	blanco y muy denso	compacta	dulce y a tempeh
10	4	32	26.5	blanco y muy denso	compacta	dulce y a tempeh
11	4	32	26.5	blanco y muy denso	compacta	dulce y a tempeh
12	4	32	26.5	blanco y muy denso	compacta	dulce y a tempeh
13	4	32	40.7	blanco, muy denso y presencia de zonas grises	compacta	tempeh y picante
14	0.6	32	26.5	blanco y muy denso	compacta	dulce
15	7.3	32	26.5	blanco, muy denso y presencia de zonas grises	compacta	a tempeh
16	2	34	18	no visible	sin textura	
17	6	34	18	visible, poco denso	compacta	dulce
18	2	34	35	blanco, denso y presencia de zonas grises	compacta	dulce y a tempeh
19	6	34	35	blanco y muy denso	compacta	a tempeh
20	4	35.3	26.5	blanco, denso y presencia de zonas grises	compacta	hongo y a tempeh

Un buen tempeh se caracteriza por presentar micelio de color blanco, denso, limitando el grado de esporulación, textura compacta y aroma agradable, fresco, característico del tempeh y sin olor a amoníaco (Norma CODEX STAN 313R-2013). Las corridas que se identifican con las características mencionadas fueron las 6 de los puntos centrales (corrida N° 7 a N° 12), las corridas N° 5 y N° 19 ambas con inóculo alto (6 log) y tiempo de fermentación de 35 horas y la corrida N°14 de inóculo bajo (0.6 log) (Tabla 6).

Optimización

Los criterios para la optimización del proceso de fermentación del tempeh de GQGir fueron nivel de inóculo en el rango entre 3 y 6 log/g, temperatura de fermentación entre 30 y 34 °C y tiempo de fermentación entre 27 y 30 horas. Los rangos fueron definidos para minimizar el tiempo de fermentación y el nivel de inóculo, dos factores importantes en el costo productivo. Para el ADN fúngico el criterio fue maximizarlo (3.42×10^2 y 1.04×10^5 ng/g de tempeh) y para la humedad se fijó en el rango entre 66 y 70 %. Además, se contempló para la optimización la calidad sensorial del tempeh como el aspecto del micelio (blanco, denso y sin grado de esporulación), la textura (compacta) y el aroma (agradable, fresco y sin olor a amoníaco).

La solución óptima del modelo cuadrático obtenido se encontró con valores de (i) nivel de inóculo de 3 log/g de grano húmedo, (ii) temperatura de fermentación de 33.08 °C y (iii) tiempo de fermentación de 27 horas con una deseabilidad de 83%. Los valores de las respuestas fueron para ADN fúngico fueron 6.64×10^4 ng/g de tempeh, para humedad 68.5 % y pH 6.1 (tabla 7).

Por lo tanto los valores óptimos para la elaboración de tempeh GQGir con la cepa NRRL 66271 fueron 3 log/g de nivel de inóculo, 33 °C de temperatura de fermentación durante un tiempo de 27 horas.

Tabla 7. Soluciones encontradas de la RSM para el proceso de fermentación de tempeh GQGir.

Solución	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	Inóculo (log/g)	Micelio (ng ADN fúngico/g tempeh)	pH	Humedad (%)	Deseabilidad
1	33.08	27.0	3	6.64×10^4	6.1	68.5	0.83

El modelo cuadrático permitió predecir los valores medios para cada respuesta con un 95 % de confianza, los cuales se muestran en la tabla 8. Para la respuesta ADN fúngico/g de tempeh la media fue 7.12×10^4 ng de ADN fúngico/g de tempeh. Los límites inferior y superior con un intervalo de confianza (IC) del 95 % fueron 6.2×10^4 y 7.9×10^4 ng ADN/g respectivamente. Para la respuesta humedad la media fue de 66.5 % y el límite inferior fue 61.1 % y el superior 71.9 % de humedad con un IC del 95 % en ambos casos.

Se realizó la confirmación experimental de la solución obteniendo una muestra con 6.8×10^4 ng de ADN fúngico por gramo de tempeh, 6.3 de pH y una humedad de 64.9 %. Estos valores se encuentran dentro del rango de valores que predijo el modelo cuadrático obtenido con un 95 % de confianza (Tabla 8). Además ésta solución produjo un tempeh con características sensoriales adecuadas en lo que respecta al micelio, textura y aroma.

Tabla 8. Predicción del modelo cuadrático en el proceso de fermentación de tempeh GQGir.

Respuestas	Media predicha	Mediana predicha	Desviación estándar (DE)	DE Media	IC del 95% límite bajo para la media	IC del 95% límite alto para la media
ADN fúngico	7.12×10^4	7.12×10^4	9.8×10^3	4.0×10^3	6.18×10^4	7.9×10^4
pH*	6.1	6.1	0	0	6.1	6.1
Humedad	66.5	66.5	7.3	2.5	61.1	71.9
*respuesta no significativa		IC: Intervalo de Confianza = 95%				

6.5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

En esta instancia del trabajo se buscó optimizar componentes importantes en el costo de producción del tempeh como el tiempo de fermentación y el inóculo. Se incluyó en el modelo a la temperatura de fermentación como otra variable importante del proceso, no asociado al costo pero fundamental para el desarrollo fúngico.

Mediante un diseño central compuesto y usando la metodología de superficie de respuesta se logró estudiar el efecto de las principales variables que influyen en el proceso de elaboración del tempeh, utilizando la cepa NRRL 66271 de *Rhizopus oligosporus* seleccionada.

Se logró optimizar la temperatura de fermentación, minimizar el tiempo de fermentación y el nivel de inóculo que maximizan el desarrollo fúngico en la matriz alimentaria seleccionada (garbanzo, quinoa roja y semillas de girasol) durante el proceso de fermentación sin afectar la calidad final del tempeh obtenido. Que la calidad del tempeh no se viera afectada no sorprende ya que las condiciones y niveles de las variables planteadas en este escenario de estudio y que definen el espacio de diseño no difieren demasiado de los utilizados en la producción local de tempeh.

7. CAPÍTULO 4.

PERFIL LIPÍDICO Y CALIDAD DE LA PROTEÍNA EN EL NUEVO TEMPEH

7.1. INTRODUCCIÓN

Este capítulo se centró en determinar el contenido y composición de la proteína y de los ácidos grasos del nuevo tempeh de GQGir elaborado con la cepa NRRL 66271 de *Rhizopus oligosporus* producido en las condiciones óptimas como nivel de inóculo de 3 log/g, temperatura de fermentación de 33 °C y durante un tiempo de fermentación de 27 horas. Además de comparar los valores de humedad, proteína y lípidos con los valores establecidos para estos parámetros en la Norma CODEX STAN 313R-2013 (Tabla 1).

Determinar el contenido de proteína y su calidad en los alimentos de origen vegetal es importante para determinar si pueden ser una buena alternativa proteica a la proteína animal. Los alimentos fermentados a base de granos y legumbres se destacan por ser ricos en proteínas, esto se debe a que generalmente se elaboran a partir de materias primas vegetales ricas en proteínas, como la soja la cual contiene alrededor de 35-45 % de proteínas en base seca y aporta todos los aminoácidos esenciales (Xiao, 2011, Zhang et al. 2022). Dado el contenido de alérgenos de la soja es importante disponer de alternativas. Sin embargo, la mayoría de los granos y legumbres generalmente presentan aminoácidos limitantes (Marsh, 2013). En estos casos la estrategia de combinar diferentes fuentes vegetales puede compensar los aminoácidos esenciales limitantes presentes en las fuentes individuales (Craig & Mangels, 2009; Babu, Bhakayaraj y Vidhyalakshmi, 2009; Marsh, 2013). Asimismo, el procesamiento de los granos a lo largo de la elaboración del tempeh (remojo, cocción y fermentación) aumenta la digestibilidad de la proteína y la disponibilidad de aminoácidos (Craig & Mangels, 2009; Marsh, 2013; Nosworthy et al., 2020). Numerosos estudios han demostrado que la cocción reduce la actividad y la concentración de factores antinutricionales como los inhibidores de tripsina, los taninos y el ácido fítico (Hefnawy, 2011). Como estos compuestos inhiben la actividad de las enzimas digestivas o secuestran nutrientes, haciéndolos así no disponibles para la digestión, cualquier reducción en los factores antinutricionales aumentaría potencialmente la digestibilidad de la proteína y, por lo tanto, aumentaría la biodisponibilidad de los aminoácidos constituyentes (Angulo-Bejarano et al., 2008; Chandra-hioe et al., 2016; Nosworthy et al., 2020).

La digestibilidad de la proteína *in vitro* (IVPD) y la puntuación de aminoácidos (AAS) son dos parámetros utilizados para determinar la calidad de las proteínas mediante la Puntuación de Aminoácidos Corregidos por la Digestibilidad de la Proteína *in vitro* (IVPDCAAS). Este parámetro se utiliza actualmente en la regulación de las declaraciones de proteínas en algunos países como por ejemplo Estados Unidos (FAO/OMS, 1991).

En Estados Unidos, el IVPDCAAS es la herramienta que se utiliza para respaldar las declaraciones de contenido de proteína aportado por la cantidad de referencia consumida habitualmente (RACC). Para tempeh, la RACC corresponde a una porción de 85 g. El nivel de proteína corregida por la RACC se divide por 50 g (que es el valor de proteína diario requerido para las personas mayores de 4 años, basado en una dieta de 2000 calorías) para obtener el porcentaje del valor diario (VD). Para llevar a cabo la declaración de contenido de proteína, "fuente excelente" de proteína, el % del valor diario debe ser al menos de un 20% (FDA, 2013). Para el tempeh, esto se traduce en 10 g de proteína, corregida por PDCAAS *in vivo*, por 85 g de tamaño de porción. Los alimentos con VD entre 10 y 20 pueden llevar la declaración de "buena fuente" de proteína que equivale en el tempeh a 5 g de proteína, corregida por PDCAAS *in vivo*, por 85 g de tamaño de porción.

Con respecto a los lípidos, si bien son energéticamente densos (37 kilojulios o 9 kilocalorías por gramo) sus consecuencias sobre la salud van más allá de su papel exclusivo como fuente de energía. Los lípidos y los ácidos grasos se metabolizan y utilizan por el cuerpo humano, alterando la función de la membrana celular, controlando la transcripción y expresión de los genes e interactuando entre ellos. Además, los lípidos de la dieta aportan el medio para la absorción de vitaminas liposolubles, contribuyen de forma importante a la palatabilidad de los alimentos y resulta destacable el papel de los ácidos grasos esenciales como el ácido graso linoleico (C18:2) y alfa-linolénico (C18:3), precursores de la serie $\omega 6$ y $\omega 3$ respectivamente, que tienen funciones primordiales en el cuerpo, como la formación de hormonas (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos entre otras) así como también ser componentes esenciales de las membranas celulares, papel destacable durante el embarazo y la lactancia y como componentes estructurales para el desarrollo del cerebro y el sistema nervioso central (FAO y FINUT, 2012). Se requiere un consumo equilibrado entre los diferentes tipos dada la función de los ácidos grasos y su efecto positivo que ejercen en la salud (FAO y FINUT, 2012). Es recomendable una baja ingesta en ácidos grasos saturados (AGS), basados en datos de morbilidad y mortalidad de enfermedad coronaria y cáncer y riesgo de síndrome metabólico y diabetes y un mayor consumo de ácidos monoinsaturados (AGM) y poliinsaturados (AGP) con una relación $w6:w3$ cercana a 4:1 (FAO y FINUT, 2012). En el tempeh el perfil de ácidos grasos resultante estará dado por la combinación de los sustratos utilizados que serán modificados durante el proceso de fermentación por el metabolismo y el desarrollo de *Rhizopus oligosporus*. Como se mencionó anteriormente, *Rhizopus oligosporus* obtiene gran parte de su energía de los lípidos, especialmente del ácido oleico (C18:1-w9) (Tahir et al., 2018).

7.2. OBJETIVO

Determinar el contenido, composición y calidad de la proteína y de los ácidos grasos en el nuevo tempeh.

7.3. METODOLOGÍA

El contenido de proteína se determinó mediante el método Kjeldahl, según el método AOAC 955.04D. El contenido de lípidos se determinó por extracción directa por solvente (éter de petróleo) según el método AOAC 945.16. El contenido de humedad fue determinado por secado en un equipo liofilizador Christ GAMMA 1- 16 LSC durante 48 horas en las siguientes condiciones: temperatura de condensador de -55 °C y presión de sublimación del hielo de 0,021 mbar. Las cenizas se determinaron en un horno de mufla a 550 °C. El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia.

Se utilizaron como valores de referencia los requisitos analíticos para el tempeh definidos en la norma CODEX STAN 313R-2013.

Contenido de proteínas

Para la determinación del contenido de proteína se tomaron 0.3 g de muestra de tempeh de GQGir liofilizada y se realizó la digestión en un bloque digestor BLOC- DIGEST en 10 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado (96 %, marca: CARLO ERBA Reagents) con 0.2 g de sulfato de cobre (CuSO_4) y 7 g de sulfato de potasio (K_2SO_4) (marca: VELP Scientifica srl) como catalizador para convertir el nitrógeno orgánico en iones amonio. El programa de digestión consistió en un primer paso a 125 °C durante 15 minutos, un segundo paso a 300 °C también durante 15 minutos y tercer y último paso a 400 °C durante 90 minutos. Luego los digeridos se dejaron enfriar y se diluyeron con 45 ml de hidróxido de sodio (NaOH) al 40 % (m/m) (marca: DORWIL S.A) para neutralizar el ácido. El amoníaco liberado se destiló mediante vapor y se atrapó en una solución de 25 ml de ácido bórico (H_3BO_3) al 4 % (m/v) (marca: CARLO ERBA Reagents) en un equipo Destilador Kjeldahl PRO-NITRO M. Por último se tituló con ácido clorhídrico (HCl) (37 % marca: DORWIL S.A) estandarizado, 0.25 M, utilizando la detección de punto final colorimétrico. Se realizaron triplicados de la muestra y dos blancos.

El porcentaje de nitrógeno se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{M \text{ HCL} \times (G_m - G_b) \text{ HCL} \times M \text{ N} \times 100}{m(g)}$$

donde “*M HCL*” es la molaridad de ácido clorhídrico (0.25), “*G_m*” es el gasto de HCl en litros de la muestra, “*G_b*” es el gasto de HCl en litros del blanco, “*M N*” es la molaridad de nitrógeno (xx), “*m*” son los gramos de muestra.

Por último se obtuvo el porcentaje de proteína en la muestra mediante el siguiente cálculo:

$$\% \text{ Proteínas} = \% \text{ N} \times F$$

donde “% N” es el porcentaje de nitrógeno y “*F*” es el factor de conversión de nitrógeno a proteína (6,25).

Perfil de aminoácidos y calidad de la proteína

Para determinar el perfil de aminoácidos y la calidad nutricional de la proteína del tempeh optimizado durante esta tesis se tomaron los datos de IVPD y AAS obtenidos a partir de una muestra anterior de tempeh GQGir producido en nuestro laboratorio en las mismas condiciones. Dichos análisis fueron realizados por el laboratorio de Procesamiento de Alimentos, Departamento de Ciencias de la Alimentación y Nutrición Humana (Food Processing Laboratory, Food and Human Nutritional Sciences Department) de la Universidad de Manitoba, Canadá ya que en Uruguay no se realiza este tipo de análisis. Allí se realizó la IVPD determinada según Franczyk (2018) y FAO/OMS (2019) y el AAS mediante Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

La composición de aminoácidos esenciales y la digestibilidad de la proteína obtenidos para la muestra enviada al laboratorio en Canadá, se muestran en la tabla 20 (Anexo A). A partir de los datos de la tabla 20 se calculó la AAS del nuevo tempeh ajustándose con el contenido de proteína obtenido por Kjeldahl. Para el IVPDCAAS se utilizó el valor de digestibilidad de la proteína (tabla 20, Anexo A) determinado por digestibilidad verdadera de 86.8 %. El IVPDCAAS (%) se calculó como el producto de la IVPD y AAS (correspondiente al aminoácido de menor valor) relativa a la proteína de referencia. Por último se evaluó la declaración del contenido proteico para el tempeh producido en este trabajo según la FDA (2013).

Determinación de lípidos y perfil de ácidos grasos

La extracción de los lípidos se determinó a partir de 3.0 g de muestra de tempeh GQGir liofilizada en un equipo DET-GRAS 6Np modelo 4002842. Se utilizó el programa 3 que consiste en dos pasos térmicos para extraer todos los lípidos de la muestra junto al solvente utilizado (éter de petróleo) y un tercer paso de recuperación del solvente (Paso 1 y 2: 90 minutos a 120 °C cada uno y Paso 3: 15 minutos a 120 °C).

Previo a la identificación y cuantificación de los ácidos grasos que conforman los lípidos en el tempeh de GQGir, se realizó, al extracto lipídico obtenido previamente, una metilación para convertir los lípidos a ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). La metilación se realizó en condiciones ácidas. Primero, se re-suspendieron los lípidos en hexano:isopropanol (3:2 v/v), a una alícuota de 100 µL se agregó metanol:ácido clorhídrico:cloroformo (10:1:1 v/v/v) y se calentó en baño de agua a 90 °C durante dos horas, agitando cada diez minutos. Luego se realizaron 3 lavados con hexano:cloroformo (4:1 v/v) de cada uno se retiró el sobrenadante (fase orgánica) y se reservó en un segundo tubo. A este segundo tubo se le agregó 0.5 de sulfato de sodio (NaSO₄) anhidro.

Para la identificación y cuantificación de ácidos grasos se utilizó un cromatógrafo de gases (GC) Agilent 7820A, equipado con una columna DB-225V (longitud: 20mm, diámetro: 0.1 mm y film: 0.1 µm) y un detector de ionización de llama (FID). Las condiciones cromatográficas fueron: flujo de aire: 400 ml/min, flujo de combustible de hidrógeno: 30 ml/min y flujo de la columna (nitrógeno: 0.2 ml/min). El programa de temperaturas del horno fue el siguiente: 40 °C durante 0.5 minutos, aumento a 195 °C a una velocidad de 25 °C por minuto, aumento a 205 °C a una velocidad de 3 °C por minuto y aumento luego a 230 °C a una velocidad de 8 °C por minuto y luego se mantiene durante 10 minutos. El volumen de inyección fue de 1 µL. Se usó el estándar Supelco de 37 componentes FAME MIX (10 mg/ml en cloruro de metileno (CH₂Cl₂) para identificación y el estándar C19:0 (0.9 mg/ml) agregado en la metilación para cuantificación.

7.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Conformidad con la norma CODEX-STAN 313-R sobre contenido de humedad, proteínas y lípidos en el nuevo tempeh

El contenido de humedad, cenizas, proteínas, lípidos y carbohidratos del nuevo tempeh de GQGir, elaborado con la cepa NRRL 66271 de *Rhizopus oligosporus* en las condiciones óptimas de producción de 33 °C de temperatura de fermentación, 3 log (1 x 10³ esporas por gramo de grano húmedo) de nivel de inóculo y durante 27 horas de fermentación, se muestran en la tabla 9. Las condiciones de elaboración trabajadas produjeron un tempeh con 61

% de humedad, 0.8 % de cenizas, 9.7 % de proteínas (24.7 % en base seca), 5.7 % de lípidos y 22.8 % de hidratos de carbono expresados cada 100 g de alimento.

Tabla 9. Humedad, proteínas y lípidos en 100 g de tempeh GQGir y valores requeridos por la Norma CODEX-STAN 313-R 2013.

	Humedad	Proteínas*	Lípidos*
Tempeh GQGir	61 %	9.7 %	5.7 %
NORMA CODEX-STAN 313-R 2013, para tempeh de soja	máximo 65 %	mínimo 15 %	mínimo 7 %

*Valores en base húmeda.

Al comparar los datos obtenidos con los requisitos analíticos para el tempeh de la norma CODEX-STAN 313R-2013 se observa que la humedad del nuevo tempeh cumple con la norma, el contenido de lípidos difiere solo en 1.3% con el valor establecido, mientras que el contenido de proteínas no llega al mínimo requerido (15 g cada 100 g de tempeh). El apartamiento en contenido de proteína establecido en la norma, es esperable ya que la norma se refiere a un tempeh elaborado a base de granos de soja que tiene un mayor aporte proteico que las legumbres, cereales y semillas que conforman la mezcla. Tomamos esta norma como referencia ya que por el momento, no hay una Norma que contemple tempeh elaborado a partir de granos diferentes a la soja.

Perfil de aminoácidos y calidad nutricional de la proteína

La estimación del perfil de aminoácidos realizada para el nuevo tempeh mostró que el nuevo tempeh contiene, por gramo de proteína, 91.48 mg de fenilalanina+tirosina, 82.78 mg de leucina, 63.96 mg de lisina, 56.87 mg de valina, 49.39 mg de isoleucina, 42.91 mg de treonina, 36.84 mg de metionina+cisteína, 27.12 mg de histidina y por último 11.74 mg de triptófano. Los datos se muestran en la tabla 10.

Con respecto a la digestibilidad de 86.8 % (IVPD en tabla 12), esto significa que de los 24.7 g de proteína en 100 g de tempeh sólo el 86.8 %, es decir 21.4 g, son digeribles por el organismo. El proceso de fermentación mejoró la digestibilidad de la proteína del tempeh ya que el porcentaje fue mayor que el valor reportado para los mismos granos sin fermentar (70-80%) (Kumitch et al., 2019).

Tabla 10. Aminoácidos esenciales (mg/g de proteína) en tempeh de GQGir

Tempeh	THR	VAL	MET+CYS	ILE	LEU	PHE+TYR	HIS	LYS	TRP
GQGir	42.91	56.87	36.84	49.39	82.78	91.49	27.12	63.96	11.74
Patrón de referencia FAO	34	35	25	28	66	63	19	58	11

THR: treonina, VAL: Valina, MET+CYS: Metionina+Cisteína, ILE: Isoleucina, LEU: Leucina, PHE+TYR: Fenilalanina+Tirosina, HIS: Histidina, LYS: Lisina y TRP: Triptófano.

Tabla 11. Puntuación de aminoácidos esenciales (Amino Acid score- AAS) en tempeh de GQGir

Tempeh	THR	VAL	MET+CYS	ILE	LEU	PHE+TYR	HIS	LYS	TRP
GQGir	1.26	1.62	1.47	1.76	1.25	1.45	1.42	1.10	1.06

THR: treonina, VAL: Valina, MET+CYS: Metionina+Cisteína, ILE: Isoleucina, LEU: Leucina, PHE+TYR: Fenilalanina+Tirosina, HIS: Histidina, LYS: Lisina y TRP: Triptófano.

La puntuación de aminoácidos fue > 1 para todos los aminoácidos, estos resultados sugieren que el tempeh GQGir es de alta calidad proteica y no presenta aminoácidos limitantes. Los datos se muestran en la tabla 11. El AAS fue 1.06 y pertenece al valor obtenido en el ensayo para el triptófano.

El IVPDCAAS fue de 0.92 y según la declaración de contenido de proteína por la FDA (2013) el tempeh podría llevar la declaración de “buena fuente” de proteína ya que contiene el 15 % del valor diario requerido (tabla 12).

Tabla 12. Calidad de la proteína in vitro y IVPDCAAS proteína corregida por RACC

Tempeh	P (g) (bs)	IVPD (%)	P (g) corregida por IVPD	AAS	IVPD- CAAS	P(g)/100 g de tempeh	P(g)por RACC	IVPDCAAS- corregida por RACC	% VD	Declaración contenido de proteína
GQGir	24.7	86.8	21.4	1.06	0.92	9.7	8.2	7.7	15	"buena fuente"

P= proteína, bs= base seca, IVPD= Digestibilidad de la Proteína *in vitro*, AAS= Puntuación de Aminoácidos, AA= aminoácidos, IVPDCAAS= Puntuación de aminoácidos Corregida por Digestibilidad de la Proteína *in vitro*, RACC = Cantidad de referencia consumida habitualmente (RACC = 85 g para tempeh), VD = Valor diario, Declaración de contenido de proteína por FDA 2013. Si %VD es $\geq 10\%$, el alimento es una "buena fuente" de proteína. Si %VD es $\geq 20\%$, el alimento es una "excelente fuente" de proteína.

Perfil de ácidos grasos

El nuevo tempeh contiene 5.7 g de lípidos totales en 100 g (Tablas 20) de los cuales 4.2 g corresponden a ácidos grasos. De éstos, 2.78 g son AGP dentro de los cuales se identificaron 2.74 g de la serie w6 (ácido linoleico-C18:2) y 0.04 g de la serie w3 (ácido alfa-linolénico-C18:3). Los AGM fueron 1.06 g conformados mayoritariamente por ácido oleico-C18:1-w9 (1.057 g) y en menor cantidad por el ácido palmitoleico-C16:1-w9 (0.003 g). El contenido de AGS es de 0.4 g, conformados por 0.3 g de ácido palmítico-C16:0 y 0.1 g de ácido esteárico-C18:0 y por último se identificaron 0.2 g de otros ácidos grasos de cadena larga. Los restantes 1.5 g pueden corresponder a otros lípidos como esteroides y/o pigmentos como carotenoides presentes en la quinoa y el girasol, dado que el extracto obtenido presentó una coloración amarilla intensa.

La composición individual de los ácidos grasos en los granos que conforman la mezcla de tempeh cocida y sin fermentar, expresada en 100 g (50 % garbanzo, 33 % quinoa y 17 % semillas de girasol) (valores obtenidos de la base de datos del Food Data Central, USDA), muestra que el aporte principal de los lípidos en dicha mezcla proviene de las semillas de girasol, conformándose en su mayoría por AGM (9.5 g) y dentro de éstos por el ácido oleico, seguido de los AGP (2.21 g) siendo en su totalidad de la serie w6 (2.21 g) y en menor proporción w3 (0.01 g) (tabla 13). La relación w6:w3 es significativamente mayor a 4:1, siendo no favorable.

El metabolismo fúngico durante la fermentación del tempeh modifica el contenido lipídico total y la composición de los ácidos grasos que lo conforman por la acción de las enzimas lipolíticas. Al comparar los datos obtenidos para el nuevo tempeh con los valores que resultan de mezclar en la misma proporción garbanzo, quinoa y girasol cocidos y sin fermentar se observó que el contenido lipídico se redujo luego de la fermentación de 11.5 a 5.7 g (tabla 13). Con respecto a los AGS y AGP se observan pequeñas variaciones y no se observó mejoría en la relación w6:w3. Sin embargo, se apreció una reducción en los AGM, de 6.1 a 1.06 g (tabla 13) explicando en gran parte la diferencia en el contenido total. Éstas reducciones en el contenido lipídico total y en los AGM son consistentes con lo encontrado en la literatura, dado que los lípidos son la fuente energética principal para el hongo *Rhizopus oligosporus* obteniendo la mayor parte de la energía de los AGM en especial del ácido oleico (Tahir et al., 2018).

Tabla 13. Valores de contenido total de lípidos y composición de ácidos grasos en el nuevo tempeh, en los granos individuales y en la mezcla sin fermentar expresados en 100 g.

	Lípidos (g)	AGS (g)	C16:0 (g)	C18:0 (g)	AGM (g)	C16:1-w 9** (g)	C18:1- w9** (g)	AGP (g)	C18:2- w6 (g)	C18:3- w3** (g)	Otros AG (g)
Nuevo tempeh	5.7	0.4	0.3	0.1	1.06	0.003	1.057	2.8	2.74	0.04	0.2
50 g Garbanzo cocido*	1.3	0.15	0.1	0.05	0.3	sd.	0.3	0.6	0.55	0.05	sd.
33 g Quinoa cocida*	0.6	0.06	0.03	sd.	0.16	sd.	0.16	0.36	0.33	0.03	sd.
17 g Semillas de girasol cocidas*	9.5	0.7	0.4	0.3	5.6	sd.	5.5	2.22	2.21	0.01	sd.
100 g de mezcla GQGir cocida sin fermentar	11.5	1.1	0.6	0.5	6.1	sd.	6.1	3.1	3.0	0.1	sd.

* datos obtenidos de Food Data Central, USDA. ** para visualizarlos en la tabla se expresaron con más cifras significativas. sd.= sin datos. AGS= Ácidos grasos saturados, AGM= Ácidos grasos monoinsaturados, AGP= Ácidos grasos poliinsaturados, AG= Ácido graso. C16:0- ácido palmítico, C18:0- ácido esteárico, C16:1- ácido palmitoleico, C18:1-ácido oleico, C18:2-ácido linoleico y C18:3-ácido alfa-linolénico.

7.5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

El tempeh GQGir obtenido en esta tesis puede definirse como una fuente de proteína de alta calidad conteniendo todos los aminoácidos esenciales sin presentar aminoácidos limitantes. Esta proteína está acompañada de un buen aporte de AGM y AGP con bajo contenido de AGS. El producto además cumple con los requisitos analíticos propuestos por el Codex Alimentarius para humedad y lípidos (muy cercano al mínimo), pero no cumple con el mínimo requerido para proteína. Este hecho no es preocupante ya que el CODEX está definido para un tempeh de soja, y por lo tanto el requisito del contenido proteico está definido acordemente. Esta norma aún no contempla la variaciones debidas al uso de otros sustratos. Los datos de este proyecto podrían contribuir a ajustar las normas para que los tempeh desarrollados con otros sustratos queden contemplados.

La composición de ácidos grasos en el nuevo tempeh está determinada por la composición de las semillas de girasol. Estas tienen un buen contenido de AGP sin embargo su relación w6:w3 está muy lejos de 4:1, valor considerado adecuado y beneficioso para la salud.

Como forma de mejorar este aspecto, una alternativa podría ser sustituir las semillas de girasol por otra semilla con una mejor composición de ácidos grasos. La semilla de cáñamo

ofrece algunas ventajas en este respecto. Tienen buen perfil de AG, conteniendo AGP en mayor proporción y además tiene buena relación de ácidos grasos esenciales w6:w3 igual a 2.5:1. Además, éstas semillas tienen un buen perfil de aminoácidos por lo tanto se mantendrá o mejorará la calidad de la proteína de un posible nuevo tempeh.

8. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

Las cepas de *Rhizopus oligosporus* de la colección NRRL estudiadas resultaron ser todas cepas puras, ya que en placa las colonias fúngicas observadas presentaron una morfología uniforme y homogénea característica de la especie. Esto es importante para garantizar la reproducibilidad y consistencia de los resultados del trabajo experimental y, en este caso, en la elaboración de tempeh. Además, es esencial para evitar contaminación y garantizar que los productos finales sean seguros.

Con respecto a la qPCR, el método implementado sugiere ser adecuado para la cuantificación de ADN de todas las cepas de *Rhizopus oligosporus* evaluadas. Además, no presentó inhibición por la matriz, por lo que se trata de un método rápido y adecuado aplicable para la cuantificación de *Rhizopus oligosporus* en matrices alimentarias como el tempeh de GQGir y monitorear su desarrollo durante la fermentación.

Las cepas de *Rhizopus oligosporus*, sometidas a las mismas condiciones de elaboración, se comportaron distinto en cuanto a la generación de micelio y aroma lo que permite una diferenciación entre ellas. Los parámetros de crecimiento fúngico obtenidos utilizando la ecuación de Baranyi & Roberts por sí solos no permitieron seleccionar una cepa ya que no siempre reflejaron el aspecto del micelio en tempeh, por lo que fue necesario incluir el aspecto visual y sensorial del tempeh para la selección. La estrategia combinada de parámetros cinéticos y sensoriales permitió seleccionar la cepa NRRL 66271 como la cepa con mayor capacidad de desarrollar tempeh y también por sus atributos sensoriales únicos que la diferencian de las otras cepas.

Se logró optimizar la temperatura de fermentación, minimizar el tiempo de fermentación y el nivel de inóculo que maximizan el desarrollo fúngico en la matriz alimentaria seleccionada durante el proceso de fermentación, con la cepa NRRL 66271, sin afectar la calidad final del tempeh obtenido. Si bien la metodología de superficie de respuesta fue adecuada para la optimización, el rango de las variables estudiadas fue muy cercano a los valores óptimos por lo tanto las respuestas, en particular el pH, no tuvieron una gran variación salvo en los puntos axiales del diseño. A pesar de esto el modelo permite visualizar la interacción entre los pares de variables tiempo y temperatura y tiempo y nivel de inóculo.

Es de remarcar que el nuevo tempeh GQGir puede definirse como una fuente de proteína de alta calidad, contiene todos los aminoácidos esenciales y no presenta aminoácidos limitantes. Según la declaración de contenido de proteína por la FDA (2013) el nuevo tempeh de GQGir podría llevar la declaración de “buena fuente” de proteína. Por otro lado, tiene muy bajo contenido de ácidos grasos saturados, aportando mayormente mono y poliinsaturados. Sin embargo la relación w6:w3 está muy lejos de 4:1, valor considerado adecuado y beneficioso

para la salud. Como forma de mejorar este aspecto se podría sustituir las semillas de girasol por semillas de mejor perfil lipídico como las de cáñamo.

Como paso futuro para impulsar la producción de tempeh se propone avanzar en el desarrollo y producción nacional del cultivo iniciador utilizando la cepa NRRL 66271. Para ello se deberán definir las condiciones para obtener esporas viables y que se mantengan en el tiempo. La posibilidad de producirlo localmente aportará beneficios al sector productivo de alimentos nacional y a los consumidores que buscan incorporar otras fuentes de proteína a su dieta.

9. REFERENCIAS

- Ahnan-Winarno, A. D., Cordeiro, L., Winarno, F. G., Gibbons, J., & Xiao, H. (2021). Tempeh: A semicentennial review on its health benefits, fermentation, safety, processing, sustainability, and affordability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1717-1767.
- Angulo-Bejarano, P. I., Verdugo-Montoya, N. M., Cuevas-Rodríguez, E. O., Milán-Carrillo, J., Mora-Escobedo, R., Lopez-Valenzuela, J. A., ... & Reyes-Moreno, C. (2008). Tempeh flour from chickpea (*Cicer arietinum* L.) nutritional and physicochemical properties. *Food Chemistry*, 106(1), 106-112.
- Babu, P. D., Bhakyaraj, R., & Vidhyalakshmi, R. (2009). A low cost nutritious food “tempeh”-a review. *World J Dairy Food Sci*, 4(1), 22-27.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3-4), 277-294. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)
- Bonny, S. P., Gardner, G. E., Pethick, D. W., & Hocquette, J. F. (2015). What is artificial meat and what does it mean for the future of the meat industry?. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(2), 255-263.
- Cankar, K., Štebih, D., Dreo, T., Žel, J., & Gruden, K. (2006). Critical points of DNA quantification by real-time PCR—effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *Bmc Biotechnology*, 6, 1-15.
- Chandra-Hioe, M. V., Wong, C. H., & Arcot, J. (2016). The potential use of fermented chickpea and faba bean flour as food ingredients. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71, 90-95.
- Chutrtong, J., & Bussabun, T. (2014). Preparation of tempeh spore powder by freeze drying. *International Journal of Bioengineering and Life Sciences*, 8(1), 40-43.
- Código de Regulaciones Federales (Administración de Alimentos y Medicamentos) [FDA], Declaraciones nutricionales. Título 21, Parte 101 “Etiquetado de alimentos” , 2013.

- Comisión del CODEX Alimentarius (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Organización Mundial de la Salud) [FAO/OMS], Norma CODEX STAN 313R-2013 (2017).
- Craig, W. J., & Mangels, A. R. (2009). Position of the American Dietetic Association: vegetarian diets. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(7), 1266.
- Dantigny, P., Marín, S., Beyer, M., & Magan, N. (2007). Mould germination: data treatment and modelling. *International journal of food microbiology*, 114(1), 17-24.
- De Nutrición, F. I. (2012). Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Consulta de expertos, 10-14 de Noviembre de 2008, Ginebra.
- Erkan, S. B., Gürler, H. N., Bilgin, D. G., Germec, M., & Turhan, I. (2020). Production and characterization of tempehs from different sources of legume by *Rhizopus oligosporus*. *Lwt*, 119, 108880.
- Feng, X. M., Eriksson, A. R. B., & Schnürer, J. (2005). Growth of lactic acid bacteria and *Rhizopus oligosporus* during barley tempeh fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 104(3), 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.005>
- Feng, X. M., Passoth, V., Eklund-Jonsson, C., Alminger, M. L., & Schnürer, J. (2007). *Rhizopus oligosporus* and yeast co-cultivation during barley tempeh fermentation-Nutritional impact and real- time PCR quantification of fungal growth dynamics. *Food Microbiology*, 24(4), 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.06.007>
- Gan, H. E., Karim, R., Muhammad, S. K. S., Bakar, J. A., Hashim, D. M., & Rahman, R. A. (2007). Optimization of the basic formulation of a traditional baked cassava cake using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 40(4), 611-618.
- Garcia, D., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2009). Predicting mycotoxins in foods: a review. *Food microbiology*, 26(8), 757-769.
- Garibaldi, M., Ashcroft, I., Lemke, J. N., Simonelli, M., & Hague, R. (2018). Effect of annealing on the microstructure and magnetic properties of soft magnetic Fe-Si produced via laser additive manufacturing. *Scripta Materialia*, 142, 121-125.

- Global Market Insights on Plant-Based Foods (2019-2026). Publicado: 2020. Disponible en: <https://univdatos.com/report/plant-based-food-market-2/>
- Handoyo, T., & Morita, N. (2006). Structural and functional properties of fermented soybean (tempeh) by using *Rhizopus oligosporus*. *International Journal of food properties*, 9(2), 347-355.
- Hefnawy, T. H. (2011). Effect of processing methods on nutritional composition and anti-nutritional factors in lentils (*Lens culinaris*). *Annals of Agricultural Sciences*, 56(2), 57-61.
- Herrera, E. A. C. (2006). Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. In *Simposio Regional de Microbiología*.
- Jeleń, H., Majcher, M., Ginja, A., & Kuligowski, M. (2013). Determination of compounds responsible for tempeh aroma. *Food Chemistry*, 141(1), 459-465.
- Jennessen, J., Schnürer, J., Olsson, J., Samson, R. A., & Dijksterhuis, J. (2008). Morphological characteristics of sporangiospores of the tempe fungus *Rhizopus oligosporus* differentiate it from other taxa of the *R. microsporus* group. *Mycological research*, 112(5), 547-563.
- Kumitch, H.M., Stone, A., Nosworthy, M.G., Nickerson, M.T., House, J.D., Korber, D.R., Tanaka, T., 2019. Effect of fermentation time on the nutritional properties of pea protein - enriched flour fermented by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. *Cereal Chem.* 104–113. doi:10.1002/cche.10234
- Kuswanto, KR, (2004). Industrialization of tempe fermentation. Gadjah Mada University. Indonesia.
- Leitzmann, C. (2014). Vegetarian nutrition: past, present, future. *The American journal of clinical nutrition*, 100, 496S-502S.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lobacz, A., Kowalik, J., & Zulewska, J. (2020). Determination of the survival kinetics of *Salmonella* spp. on the surface of ripened raw milk cheese during storage at

- different temperatures. *International journal of food science & technology*, 55(2), 610-618.
- Marsh, K. A., Munn, E. A., & Baines, S. K. (2013). Protein and vegetarian diets. *Med J Aust*, 199(4 Suppl), S7-S10.
- Martinez-Silveira, A., Villarreal, R., Garmendia, G., Rufo, C., & Vero, S. (2019). Process conditions for a rapid in situ transesterification for biodiesel production from oleaginous yeasts. *Electronic Journal of Biotechnology*, 38, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.11.006>
- Mazaheri, D., & Shojaosadati, S. A. (2013). Mathematical models for microbial kinetics in solid-state fermentation: a review. *Iranian Journal of Biotechnology*, 11(3), 156-167.
- Meza, R., Monroy, A., Rodríguez, P., Pedroza, A., Poutou, R., & Mercado, M. (2002). Evaluación de la estabilidad del método de criopreservación en glicerol para el establecimiento de un banco de cepas. *Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá DC, Colombia.*
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., Vining, G. G., Borror, C. M., & Kowalski, S. M. (2004). Response surface methodology: a retrospective and literature survey. *Journal of quality technology*, 36(1), 53-77.
- Niva, M., & Vainio, A. (2021). Towards more environmentally sustainable diets? Changes in the consumption of beef and plant-and insect-based protein products in consumer groups in Finland. *Meat Science*, 182, 108635.
- Nosworthy, M. G., Medina, G., Franczyk, A. J., Neufeld, J., Appah, P., Utioh, A., ... & House, J. D. (2018). Thermal processing methods differentially affect the protein quality of Chickpea (*Cicer arietinum*). *Food science & nutrition*, 8(6), 2950-2958.
- Nout, M. J. R., & Kiers, J. L. (2005). Tempe fermentation, innovation and functionality: Update into the third millenium. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), 789–805. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02471.x>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Organización Mundial de la Salud, Universidad de las Naciones Unidas [FAO/OMS/UNU]

Owens, J. D., Astuti, M. A. R. Y., & Kuswanto, K. R. (2015). Tempe and related products. *Indigenous fermented foods of Southeast Asia*, 1-108.

Parés-Casanova, P. M., & Kucherovala, I. (2014). Comparación de modelos no lineales para describir curvas de crecimiento en la cabra catalana. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(3), 390-398.

Pilco, C. J., Torres, D. N., Ramón, R., Guerrero, N. J., Moso, K. B., Monar, N., ... & Bayas-Morejón, F. (2019). Analysis of protein, fiber content and amino acid profiles in Tempeh obtained by fermentation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and quinoa (*Chenopodium quinoa*) with *Rhizopus oligosporus*. *EurAsian Journal of BioSciences*, 13(2), 1195-1199.

Pisol, B., Abdullah, N., Khalil, K. A., & Nuraida, L. (2015). Isolation and identification of lactic acid bacteria from different stages of traditional Malaysian tempeh production. *Malaysian Journal of Microbiology*, 358-364.

Poore, J., & Nemecek, T. (2018). Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science*, 360(6392), 987-992.

Reddy, M. R., Veena, S., & Savalgi, V. P. (2008). Utilization of minor millets for tempeh production. *Asian Journal of Bio Science*, 3(2), 311-316.

Renault, D., & Wallender, W. W. (2000). Nutritional water productivity and diets. *Agricultural Water Management*, 45(3), 275-296. [https://doi.org/10.1016/S0378-3774\(99\)00107-9](https://doi.org/10.1016/S0378-3774(99)00107-9)

Reyes-Bastidas, M., Reyes-Fernández, E. Z., López-Cervantes, J., Milán-Carrillo, J., Loarca-Piña, G. F., & Reyes-Moreno, C. (2010). Physicochemical, nutritional and antioxidant properties of tempeh flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Science and Technology International*, 16(5), 427-434. <https://doi.org/10.1177/1082013210367559>

Reyes-Moreno, C., Cuevas-Rodríguez, E. O., Milán-Carrillo, J., Cárdenas-Valenzuela, O. G., & Barrón-Hoyos, J. (2004). Solid state fermentation process for producing chickpea (*Cicer arietinum* L) tempeh flour. Physicochemical and

nutritional characteristics of the product. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(3), 271-278.

Schaafsma, G. (2000). The protein digestibility–corrected amino acid score. *The Journal of nutrition*, 130(7), 1865S-1867S.

Science Tuesday del blog del USDA del Laboratorio Nacional de Ciencias (NSL), parte del Servicio de Comercialización Agrícola (AMS) del USDA. Las vidas secretas de los químicos de alimentos del USDA. Publicado por el Dr. Michael D. Sussman, Director de la División de Investigación y Ciencia del Laboratorio AMS, 28 de febrero de 2012.

Shurtleff, W., Aoyagi, A. (2021) *The book of Tempeh*. Ten Speed Press

Sparringa, R. A., & Owens, J. D. (1999a). Causes of alkalization in tempe solid substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(8–9), 677–681. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00097-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00097-6)

Sparringa, R. A., & Owens, J. D. (1999b). Glucosamine content of tempe mould, *Rhizopus oligosporus*. *International Journal of Food Microbiology*, 47(1–2), 153–157. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00020-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00020-3)

Sparringa, R. A., & Owens, J. D. (1999c). Inhibition of the tempe mould, *Rhizopus oligosporus*, by ammonia. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2), 93–96. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00591.x>

Sparringa, R. A., Kendall, M., Westby, A., & Owens, J. D. (2002). Effects of temperature, pH, water activity and CO₂ concentration on growth of *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. *Journal of Applied Microbiology*, 92(2), 329-337.

Starzyńska-Janiszewska, A., Stodolak, B., Gómez-Caravaca, A. M., Mickowska, B., Martín-García, B., & Byczyński, Ł. (2019). Mould starter selection for extended solid-state fermentation of quinoa. *LWT*, 99, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.055>

Tahir, A., Anwar, M., Mubeen, H., & Raza, S. (2018). Evaluation of physicochemical and nutritional contents in soybean fermented food tempeh by *Rhizopus oligosporus*. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 17(1), 1-9.

Tremarin, A., Longhi, D. A., Salomão, B. D. C. M., & Aragão, G. M. F. (2015). Modeling the growth of *Byssoschlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* on

solidified apple juice by measuring colony diameter and ergosterol content. *International Journal of Food Microbiology*, 193, 23-28.

UnivDatos Market Insights (2020) *Perspectivas del mercado global sobre alimentos de origen vegetal 2019-2026*. Editorial UMI, <https://normas-apa.org/referencias/citar-informes-reportes/>

Vital, R. J., Bassinello, P. Z., Cruz, Q. A., Carvalho, R. N., De Paiva, J. C., & Colombo, A. O. (2018). Production, quality, and acceptance of tempeh and white bean tempeh burgers. *Foods*, 7(9), 136. <https://doi.org/10.3390/foods7090136>

Wikandari, R., Millati, R., Lennartsson, P. R., Harmayani, E., & Taherzadeh, M. J. (2012). Isolation and characterization of zygomycetes fungi from tempe for ethanol production and biomass applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167, 1501-1512.

Xiao, Y., Fan, J., Chen, Y., Rui, X., Zhang, Q., & Dong, M. (2016). Enhanced total phenolic and isoflavone aglycone content, antioxidant activity and DNA damage protection of soybeans processed by solid state fermentation with *Rhizopus oligosporus* RT-3. *RSC advances*, 6(35), 29741-29756.

Zhang, Y., Wei, R., Azi, F., Jiao, L., Wang, H., He, T., ... & Lu, B. (2022). Solid-state fermentation with *Rhizopus oligosporus* RT-3 enhanced the nutritional properties of soybeans. *Frontiers in Nutrition*, 9, 972860.

Zimet, P., Mombrú, Á. W., Faccio, R., Brugnini, G., Miraballes, I., Rufo, C., & Pardo, H. (2018). Optimization and characterization of nisin-loaded alginate-chitosan nanoparticles with antimicrobial activity in lean beef. *LWT - Food Science and Technology*, 91(January), 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.015>

10. ANEXOS

ANEXO A. TABLAS

Tabla 14. Información de las cepas de *Rhizopus oligosporus* solicitadas a la Colección de la NRRL

NRRL	Nombre	Fuente	Aislamiento	Año	Características		
					Día 1	Día 2	Día 7
2549	<i>Rhizopus oligosporus</i> saito	LM Olah, Bogor, Indonesia	Comida Tempeh	1956	Micelio visible	micelio blanco, poco denso	Esporas gris oscuro
2710	<i>R. microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> (Saito) Schipper y Stalpers	HK Steinkraus, Expt. de Agricultura de Nueva York. Estación	Comida, tempeh Indonesia	1958	Micelio visible	micelio blanco, muy denso	Esporas gris oscuro
3271	<i>R. oligosporus</i> saito	Ko Swan Djien, Bandung, Indonesia	Tempeh	1960	Micelio visible	micelio blanco y denso, con de esporas	Esporas gris oscuro
5865	<i>Rhizopus oligosporus</i> saito	Ko Swan Djien, Bandung, Indonesia	Tempeh, Java, Indonesia	1961	Micelio visible	micelio blanco y denso, con de esporas	Esporas gris oscuro
5905	<i>Rhizopus oligosporus</i> saito	Ko Swan Djien, Boudung, Indonesia	Comida, Tempeh, Java, Indonesia	1961	Micelio visible	micelio blanco y denso, con esporas	Esporas gris oscuro
66266	<i>Rhizopus oligosporus</i> saito	Ko Swan Djien, Boudung, Indonesia	Tempeh, Java, Indonesia	1961	Micelio visible	Presencia de esporas	Esporas gris oscuro/negro
66270	<i>Rhizopus oligosporus</i> saito	R. Steevensz, Golden Roof Foods, Norwalk, California	Tempeh, Indonesia	1967	Micelio visible	Presencia de esporas	Esporas gris oscuro/negro
66271	<i>Rhizopus oligosporus</i> saito	Ko Swan Djien, Universidad Ag, Wageningen, Países Bajos	Iniciador tempeh, Canadá	1980	Micelio visible	Presencia de esporas	Esporas gris oscuro/negro

Tabla 15. Cuantificación de ADN de cepas de *Rhizopus oligosporus* mediante espectrofotometría UV.

Muestra	lectura 1	lectura 2	Media Cuantificación de ADN (ng/ul)	Desviación estándar	Relación A260/A280
NRRL 2549	13.9	13.7	13.80	0.14	1.7
NRRL 2710	7.4	7.2	7.3	0.14	1.8
NRRL 3271	12.70	13.1	12.9	0.28	1.8
NRRL 5865	42.8	42.8	42.8	0.00	1.9
NRRL 5905	13.1	13.4	13.2	0.21	1.7
NRRL 66266	32.1	32.2	32.1	0.07	1.8
NRRL 66270	12.6	12.6	12.6	0.00	1.8
NRRL 66271	23.70	23.5	23.6	0.14	1.8

La tabla 16 muestra la media (de los duplicados de qPCR) de los datos correspondientes a la cuantificación fúngica mediante qPCR de las tres curvas de calibración con su desviación estándar y la cuantificación de ADN fúngico, de las mismas muestras, mediante espectrofotometría UV.

Tabla 16. Valores de ADN fúngico en ng/uL obtenidos por qPCR y espectrofotometría UV.

Cepa fúngica	Ensayos	Media ADN fúngico por qPCR (ng/μL)	DE	ADN fúngico por espectrofotometría UV (ng/μL)
NRRL 2549	1	13.9	0.02	13.8
	2	14.3	0.06	13.8
	3	13.3	0.01	13.8
NRRL 2710	1	6.8	0.01	7.3
	2	7.3	0.28	7.3
	3	7.5	0.70	7.3
NRRL 3271	1	12.4	0.05	12.9
	2	12.2	0.83	12.9
	3	12.2	0.84	12.9
NRRL 5865	1	42.8	0.01	42.8
	2	42.4	0.01	42.8
	3	42.9	0.70	42.8
NRRL 5905	1	12.6	0.12	13.2
	2	13.1	0.00	13.2
	3	13.1	0.02	13.2
NRRL 66266	1	32.3	0.31	32.1
	2	32.4	0.37	32.1
	3	32.4	0.44	32.1
NRRL 66270	1	12.6	0.13	12.6
	2	11.2	0.60	12.6
	3	12.2	0.62	12.6
NRRL 66271	1	20.6	0.02	23.6
	2	22.8	0.00	23.6
	3	23.1	0.04	23.6

DE= desviación estándar

Tabla 17. Comparación entre los valores de Ct obtenidos utilizando agua y matriz como diluyente del ADN fúngico durante la PCR en tiempo real

ADN ng/ μ L	Media Ct matriz + NRRL 66271	Desviación Estándar	Media Ct agua + NRRL 66271	Desviación Estándar	Diferencia entre Ct*
4.30E+00	14.18	0.33	14.51	0.26	0.33
4.30E-01	17.35	0.17	17.35	0.40	0.00
4.30E-02	20.52	0.00	20.42	0.04	0.10
4.30E-03	23.42	0.16	23.43	0.06	0.01
4.30E-04	27.75	0.46	27.33	0.09	0.42

* Valores de Ct difieren significativamente si la diferencia es > 0.5

Tabla 18. Cuantificación de ADN fúngico mediante qPCR en tempeh de GQGir

		Tiempo de fermentación (horas)							
Cepa		0	9	12	15	20	24	33	
NRRL 2549	ADN fúngico (ng/g)	Media	1.52x10 ¹	9.38x10 ¹	3.43x10 ²	1.79x10 ²	1.35x10 ³	3.36x10 ³	2.27x10 ⁵
		DE	2.19x10 ⁰	2.37x10 ¹	3.91x10 ¹	5.30x10 ⁻¹	1.64x10 ²	1.06x10 ²	3.85x10 ⁴
	ADN fúngico (log/g)	Media	1.17	1.96	2.53	2.25	3.12	3.62	5.35
		DE	0.06	0.11	0.05	0.00	0.05	0.15	0.07
NRRL 2710	ADN fúngico (ng/g)	Media	2.06x10 ⁰	5.89x10 ⁰	1.36x10 ¹	6.75x10 ⁰	2.82x10 ³	8.99x10 ³	1.59x10 ⁴
		DE	1.69x10 ⁰	4.37x10 ⁰	2.82x10 ⁻²	6.36x10 ⁻¹	7.51x10 ²	5.30x10 ¹	9.30x10 ³
	ADN fúngico (log/g)	Media	0.22	0.70	0.99	0.83	3.38	3.89	3.96
		DE	0.41	0.36	0.23	0.04	0.33	0.01	0.00
NRRL 3271	ADN fúngico (ng/g)	Media	3.38x10 ⁰	1.62x10 ⁰	3.40x10 ¹	7.31x10 ¹	8.16x10 ²	4.93x10 ³	6.13x10 ³
		De	2.20x10 ⁰	4.67x10 ⁻¹	1.41x10 ¹	1.21x10 ¹	1.11x10 ²	3.25x10 ²	2.12x10 ²
	ADN fúngico (log/g)	Media	0.48	0.20	1.51	1.86	2.91	3.78	3.79
		DE	0.31	0.13	0.17	0.07	0.06	0.16	0.02
NRRL 5865	ADN fúngico (ng/g)	Media	4.15x10 ⁰	1.29x10 ¹	3.38x10 ²	2.57x10 ³	4.83x10 ⁴	8.78x10 ⁴	9.96x10 ³
		DE	5.66x10 ⁻¹	4.67x10 ⁰	2.65x10 ²	7.28x10 ²	1.61x10 ⁴	9.65x10 ⁴	4.08x10 ³
	ADN fúngico (log/g)	Media	0.62	1.10	2.44	3.40	4.671	4.242	3.98
		DE	0.06	0.16	0.38	0.12	0.15	0.07	0.18
NRRL 5905	ADN fúngico (ng/g)	Media	6.95x10 ⁰	7.98x10 ⁰	2.56x10 ¹	4.16x10 ²	1.05x10 ⁴	4.49x10 ³	4.38x10 ³
		DE	4.53x10 ⁰	2.75x10 ⁰	1.92x10 ¹	1.78x10 ²	3.62x10 ³	5.16x10 ²	3.95x10 ³
	ADN fúngico (log/g)	Media	0.79	0.89	1.34	2.60	4.00	3.65	3.53
		DE	0.31	0.15	0.36	0.19	0.15	0.05	0.46
NRRL 66266	ADN fúngico (ng/g)	Media	7.60x10 ⁻¹	6.65x10 ⁻¹	1.91x10 ⁰	7.05x10 ⁰	8.26x10 ²	2.63x10 ³	2.27x10 ³
		DE	8.49x10 ⁻¹	2.62x10 ⁻¹	1.69x10 ⁻¹	2.90x10 ⁰	5.57x10 ³	3.88x10 ³	2.63x10 ³
	ADN fúngico (log/g)	Media	0.20	0.33	1.90	0.83	2.86	3.43	3.35
		DE	0.65	0.17	0.04	0.18	0.32	0.06	0.05
NRRL 66270	ADN fúngico (ng/g)	Media	1.57x10 ⁰	3.53x10 ¹	3.26x10 ²	7.94x10 ³	3.45x10 ⁴	2.24x10 ⁵	2.05x10 ⁴
		DE	5.37x10 ⁻¹	1.48x10 ¹	1.53x10 ²	1.11x10 ³	8.17x10 ³	2.98x10 ⁴	4.83x10 ³
	ADN fúngico (log/g)	Media	0.18	1.53	2.49	3.89	4.53	4.89	4.30
		DE	0.15	0.19	0.21	0.06	0.10	1.05	0.10
NRRL 66271	ADN fúngico (ng/g)	Media	2.78x10 ¹	2.33x10 ¹	1.82x10 ²	3.68x10 ³	3.25x10 ⁴	7.74x10 ³	2.62x10 ⁴
		DE	6.06x10 ⁰	5.72x10 ⁰	1.14x10 ²	1.04x10 ³	3.13x10 ³	1.30x10 ³	6.35x10 ³
	ADN fúngico (log/g)	Media	1.44	1.36	2.21	3.56	4.51	3.89	4.41
		DE	0.10	0.11	0.30	0.12	0.04	0.07	0.11
DE: Desviación estándar									

Tabla 19. Evolución de los valores de pH en el tempeh de GQGir elaborado a partir de diferentes cepas de *Rhizopus oligosporus*.

		Tiempo de fermentación (horas)						
		0	9	12	15	20	24	33
NRRL 2549	Media	5.1	5.5	5.9	6.1	6.1	6.2	6.3
	Desviación estándar	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0
NRRL 2710	Media	5.1	5.5	5.7	5.8	6.3	6.5	6.2
	Desviación estándar	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
NRRL 3271	Media	5.1	5.3	5.7	5.9	6.3	6.3	6.3
	Desviación estándar	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0
NRRL 5865	Media	5.2	6.1	6.2	6.4	6.5	6.8	6.9
	Desviación estándar	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NRRL 5905	Media	5.1	5.9	6.1	6.0	6.2	6.5	6.6
	Desviación estándar	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0
NRRL 66266	Media	5.1	5.9	6.0	6.1	6.2	6.2	6.3
	Desviación estándar	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NRRL 66270	Media	5.2	5.9	6.0	6.1	6.2	6.2	6.3
	Desviación estándar	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NRRL 66271	Media	5.1	5.9	6.0	6.1	6.2	6.4	6.4
	Desviación estándar	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0

Tabla 20. Composición de aminoácidos de la proteína (g/100 g tal como se recibieron; calculada utilizando pesos moleculares hidratados) y valor de digestibilidad de la proteína *in vitro* (IVPD) de un tempeh de garbanzo, quinoa y girasol .

Muestra	IVPD (%)	THR	VAL	MET+CYS	ILE	LEU	PHE+TYR	HIS	LYS	TRP
Tempeh de garbanzo, quinoa y girasol	86.8	1.06	1.38	0.91	1.22	2.02	2.26	0.67	1.58	0.29

G= Garbanzo, Q= Quinoa, Gir= Girasol.

THR: treonina, VAL: Valina, MET+CYS: Metionina +Cisteína, ILE: Isoleucina, LEU: Leucina, PHE+TYR: Fenilalanina + Tirosina, HIS: Histidina, LYS: Lisina y TRP: Triptófano

IVPD- Franczyk (2018) Regresión (digestibilidad verdadera)

ANEXO B.

TEMPERATURA INTERNA DEL TEMPEH GQGir DURANTE LA FERMENTACIÓN

La figura 20 muestra los cambios de temperatura durante la fermentación del tempeh a 32 °C elaborados con las diferentes cepas de *Rhizopus oligosporus*. Se observaron cambios en la temperatura interna de los tempehs mediados por el metabolismo fúngico. La temperatura en el interior de la masa del tempeh aumentó gradualmente en todas las cepas hasta acercarse a la temperatura de la cámara de fermentación (32 °C), donde permaneció constante hasta aproximadamente quince horas. NRRL 66271 fue la primera cepa en sobrepasar la temperatura de la cámara (a las 15,15 horas) y NRRL 2510 fue la última (a las 17,35 horas). Luego debido a la liberación de calor de la actividad metabólica del hongo la temperatura interna comenzó a aumentar llegando a una temperatura máxima, correspondiente al inicio de la segunda fase (Sparringa & Owens, 1999b). La temperatura máxima fue diferente para cada cepa y para todos los casos fue inferior a 36,2 °C. La temperatura de la cámara durante la fermentación se mantuvo constante.

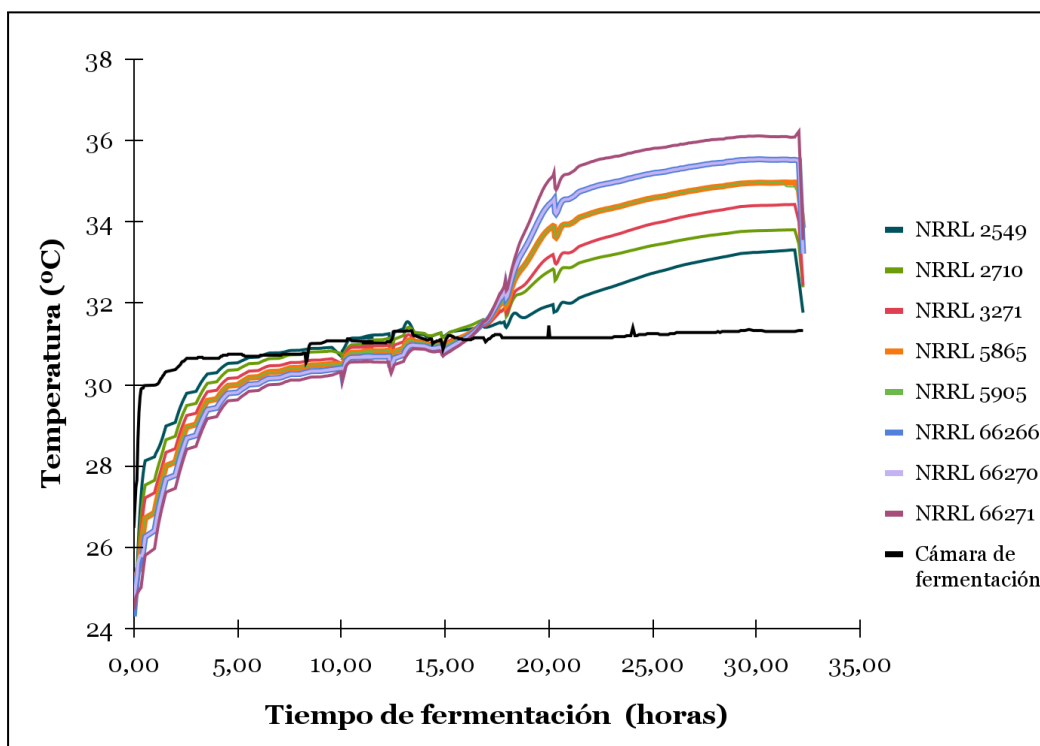


Figura 20. Cambios en la temperatura interna del tempeh mediados por la actividad metabólica de las cepas de *Rhizopus oligosporus*.

ANEXO C. PROCEDIMIENTOS

1. Procedimiento para la preparación de esporas de *Rhizopus oligosporus* en suspensión

- sembrar las cepas recuperadas en PDB en tubos de PDA inclinados y dejar crecer a 28°C durante 6-7 días o hasta que la esporulación sea visible como un algodón negro.
- agregar 5 ml agua destilada estéril al tubo falcon de 15ml
- agitar vigorosamente hasta que las esporas de los esporangios se suelten y entren en suspensión.
- Colar en gasa estéril el sobrenadante para eliminar micelio y agar, dejando la suspensión en tubo falcon estéril de 50 ml.
- Agregar nuevamente agua estéril al tubo de 15 ml (5 ml), agitar y colar con gasa. Repetir si es necesario. Por último agregar agua estéril a la gasa para recuperar la mayor cantidad de esporas.
- Centrifugar en centrífuga Sigma 3-30K a 3000 RPM 10 min a 20 °C - pipetear el sobrenadante y desecharlo. Volver a centrifugar y retirar sobrenadante
- Suspender el pellet de esporas en 5ml de agua y Tween 80 (0.1%) estéril.
- Agitar en vortex
- Almacenar 4 °C hasta su uso

Materiales: agua destilada estéril, Tween 80, falcon estéril 50 ml, gasa estéril, pipetas, tips, gradilla, Centrífuga Sigma 3-30K, vortex.

2. Procedimiento de purificación de ADN con kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Zymo

Preparación muestra micelio: La muestra para la extracción se preparó a partir de 30 mg de micelio liofilizado en 1 ml de buffer fosfato salino (PBS), se homogeneizó y se tomó 200 µL.

Preparación muestra tempeh: La muestra para la extracción se preparó a partir de 3 g de tempeh liofilizado y molido en 30 ml de PBS, se homogeneizó 2 minutos en stomacher, se realizó una toma de 2 ml de la muestra en y se centrifugó a 10000 rpm durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y se suspendió el pellet en 750 µL del buffer de lisis *BashingBead™*, se pipeteó la muestra y pasó al tubo de lisis ZR *BashingBead™* (continuar parte 2. del procedimiento)

1. Adicionar 200 µL de la muestra fúngica en el tubo de lisis ZR *BashingBead™* (0.1 mm & 0.5 mm). Adicionar al tubo 750 µL de buffer *BashingBead™*.
2. Colocar en mixer durante 30 minutos.

3. Centrifugar el *tubo de lisis ZR BashingBead™* (0.1 mm & 0.5 mm) a 10000 xg durante 1 minuto.
4. Transferir 400 µL del sobrenadante a un *filtro Zymo-Spin™* con *tubo colector* y centrifugar a 8000 xg durante 1 minuto.
5. Descartar el *filtro Zymo-Spin™* y adicionar 1200 µL de *Buffer Lisis Genómico* en el filtrado del *tubo colector* del paso 4
6. Transferir 800 µL de la mezcla del paso 5 a la *columna³ Zymo-Spin™ IICR* en un *tubo colector* y centrifugar 10000 xg durante 1 minuto.
7. Descartar el líquido del *tubo colector* y repetir el paso 6.
8. Adicionar 200 µL de *Buffer DNA Pre-Wash* en la *columna³ Zymo-Spin™ IICR* en un nuevo *tubo colector* y centrifugar a 10000 xg por 1 minuto.
9. Adicionar 500 µL *Buffer g-DNA Wash* en la *columna³ Zymo-Spin™ IICR* y centrifugar a 10000 xg por 1 minuto.
10. Transferir la *columna³ Zymo-Spin™ IICR* a un microtubo limpio de 1.5 ml y adicionar 100 µL (35 µL mínimo) de *Buffer de elución de ADN* directamente en la columna. centrifugar a 10000 xg por 30 segundos para eludir el ADN.

ANEXO D. TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS

“Tempeh: Composición nutricional y calidad de la proteína en alimentos fermentados con *Rhizopus spp*”. Presentado en formato póster en el 7º Congreso Uruguayo de Química Analítica (CUQA7) los días 26, 27 y 28 de octubre de 2022 en Montevideo, Uruguay.



cuqa⁷
Congreso Uruguayo de Química Analítica
26 al 28 de octubre de 2022

Tempeh: Composición nutricional y calidad de la proteína en alimentos fermentados con *Rhizopus spp*.



polo tecnológico
química - biotecnología



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

¹ Alimentos y Nutrición, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.
² Food Processing Laboratory, Food and human Nutritional Sciences Department, University of Manitoba, Canadá
³ Aminoteka, Montevideo, Uruguay

Romina Boccaagni¹
Filiz Köksel²
Pinar Köksel³
Caterina Rufo¹
Belen Abella¹

1. INTRODUCCIÓN

El Tempeh es un alimento fermentado de origen vegetal con un alto contenido proteico (40-50% en base seca), producto de una fermentación controlada de legumbres y/o cereales con el hongo filamentoso del género *Rhizopus spp*. Durante el proceso de fermentación el crecimiento del micelio fúngico une los granos en un nuevo producto de valor agregado y estructura compacta^[1]. Además, la gran variedad de enzimas producidas por el *Rhizopus* hidrolizan los ingredientes alimentarios aumentando la digestibilidad y contribuyendo al desarrollo de una textura, sabor y aroma deseables en el producto^[2]. Tradicionalmente se elabora a partir de granos de soja, pero puede producirse a partir de otras materias primas. Mediante las mezclas de diferentes fuentes de proteínas se pueden compensar los aminoácidos limitantes presentes en las fuentes individuales logrando un alimento de proteína completa^[3]. Es originario de Indonesia y en la actualidad tiene un atractivo cada vez mayor, satisfaciendo una creciente demanda de consumidores que buscan alternativas a la proteína animal.



2. OBJETIVO

Se evaluó la composición nutricional y la calidad de la proteína de 2 variedades de tempeh: tempeh a base de soja y a base de una mezcla de garbanzos (50%), quinoa (33%) y semillas de girasol (17%) (G-Q-Gir) inoculados con *Rhizopus spp* como alternativa proteica de alta calidad.

3. MÉTODOS

LABORATORIO ALIMENTOS Y NUTRICIÓN, IPTP, URUGUAY		FOOD PROCESSING LABORATORY, CANADÁ	
CONDICIONES PRODUCCIÓN DE TEMPEH: HUMEDAD: 40-50% pH 4,5-5 INÓCULO: 1x10 ⁸ esporas <i>Rhizopus spp</i> /g FERMENTACIÓN: 35°C/24hs		COMPOSICIÓN NUTRICIONAL AOAC Oficial Method, 2006 Proteína, Grasas, Perfil AG, humedad, cenizas y carbohidratos.	

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

LABORATORIO ALIMENTOS Y NUTRICIÓN IPTP, URUGUAY							FOOD PROCESSING LABORATORY, CANADÁ																																																						
COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE TEMPEH							VALORES DE PROTEÍNA Y NUTRICIÓN																																																						
Los resultados muestran que los tempehs tienen un alto aporte proteico y buena proporción de macronutrientes. 100 gr de tempeh de soja (bs) contiene 40,70 g de proteína, mientras que el tempeh de G-Q-Gir (bs) contiene 20,65 g. Los niveles más bajos de proteínas en la mezcla es esperables, ya que las legumbres y los cereales contienen un nivel de proteína menor que el de la soja ^[10,11] .							Calidad Proteica AAS ➔ mg AA proteína estudio/ mg AA proteína patrón Tabla 2. Puntuaciones de Aminoácidos Esenciales (Amino Acid Scores: AAS) <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Muestra</th> <th>THR</th> <th>VAL</th> <th>SAA</th> <th>ILE</th> <th>LEU</th> <th>AAA</th> <th>HS</th> <th>LYS</th> <th>TRP</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Soja</td> <td>1,18</td> <td>1,41</td> <td>1,06</td> <td>1,63</td> <td>1,19</td> <td>1,39</td> <td>1,31</td> <td>1,08</td> <td>1,13</td> </tr> <tr> <td>G-Q-Gir</td> <td>1,08</td> <td>1,37</td> <td>1,26</td> <td>1,50</td> <td>1,06</td> <td>1,24</td> <td>1,21</td> <td>0,94</td> <td>0,91</td> </tr> </tbody> </table>							Muestra	THR	VAL	SAA	ILE	LEU	AAA	HS	LYS	TRP	Soja	1,18	1,41	1,06	1,63	1,19	1,39	1,31	1,08	1,13	G-Q-Gir	1,08	1,37	1,26	1,50	1,06	1,24	1,21	0,94	0,91																		
Muestra	THR	VAL	SAA	ILE	LEU	AAA	HS	LYS	TRP																																																				
Soja	1,18	1,41	1,06	1,63	1,19	1,39	1,31	1,08	1,13																																																				
G-Q-Gir	1,08	1,37	1,26	1,50	1,06	1,24	1,21	0,94	0,91																																																				
Tabla 1. Composición de macronutrientes en tempeh <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Muestra</th> <th>Proteína (Nbs)^a</th> <th>DP^b</th> <th>Proteína (Nbs)^c</th> <th>Grasa (Nbs)^c</th> <th>OS (Nbs)^c</th> <th>AGP^d</th> <th>Carbohidratos (g)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Soja</td> <td>40,70</td> <td>0,87</td> <td>14,65</td> <td>7,76</td> <td>0,2</td> <td>4,77</td> <td>12,39</td> </tr> <tr> <td>G-Q-Gir</td> <td>20,65</td> <td>0,02</td> <td>8,47</td> <td>5,22</td> <td>0,1</td> <td>2,82</td> <td>26,40</td> </tr> </tbody> </table>							Muestra	Proteína (Nbs) ^a	DP ^b	Proteína (Nbs) ^c	Grasa (Nbs) ^c	OS (Nbs) ^c	AGP ^d	Carbohidratos (g)	Soja	40,70	0,87	14,65	7,76	0,2	4,77	12,39	G-Q-Gir	20,65	0,02	8,47	5,22	0,1	2,82	26,40	Calidad Proteica IVPD/IVPDCAAS ➔ IVPDCAAS = %IVPD x AAS Tabla 3. Valores en tempeh de Digestibilidad Proteica in vitro (IVPD) y Digestibilidad Proteica in vitro corregida por score de aminoácidos (IVPDCAAS) <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Muestra</th> <th>Proteína (Nbs)^a</th> <th>DP grano^a</th> <th>IVPD^b</th> <th>SO IVPD</th> <th>IVPDCAAS</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Canela</td> <td></td> <td></td> <td>94</td> <td>0,8</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Soja</td> <td>40,70</td> <td>80-85%</td> <td>87,3</td> <td>0,5</td> <td>0,92</td> </tr> <tr> <td>G-Q-Gir</td> <td>20,65</td> <td>70-80%</td> <td>86,6</td> <td>0,7</td> <td>0,79</td> </tr> </tbody> </table>							Muestra	Proteína (Nbs) ^a	DP grano ^a	IVPD ^b	SO IVPD	IVPDCAAS	Canela			94	0,8		Soja	40,70	80-85%	87,3	0,5	0,92	G-Q-Gir	20,65	70-80%	86,6	0,7	0,79
Muestra	Proteína (Nbs) ^a	DP ^b	Proteína (Nbs) ^c	Grasa (Nbs) ^c	OS (Nbs) ^c	AGP ^d	Carbohidratos (g)																																																						
Soja	40,70	0,87	14,65	7,76	0,2	4,77	12,39																																																						
G-Q-Gir	20,65	0,02	8,47	5,22	0,1	2,82	26,40																																																						
Muestra	Proteína (Nbs) ^a	DP grano ^a	IVPD ^b	SO IVPD	IVPDCAAS																																																								
Canela			94	0,8																																																									
Soja	40,70	80-85%	87,3	0,5	0,92																																																								
G-Q-Gir	20,65	70-80%	86,6	0,7	0,79																																																								

Tempeh de soja tuvo el AAS más alto 1,06 y no presentó ningún aminoácido limitante (AAL) mientras que el Tempeh G-Q-Gir el AAS fue de 0,91 y presentó LAA: triptófano.

Los altos valores de IVPD obtenidos demuestran que el proceso de fermentación incrementa la digestibilidad de las proteínas de granos, legumbres y cereales.

5. CONCLUSIONES

Las dos variedades de tempeh tienen un alto contenido proteico y una buena proporción de macronutrientes. Tempeh de soja tiene un 40,70% y G-Q-gir un 20,65% de proteínas en base seca. Con respecto a la calidad de las proteínas, el tempeh de soja (1,06) tuvo el puntaje de aminoácidos más alto en comparación con el tempeh de mezcla (0,91). El tempeh de soja no presentó ningún Aminoácido Limitante (LAA) y calificaría como proteína completa, sin embargo el tempeh de G-Q-Gir presentó el triptófano como LAA. Por lo tanto, aumentar ligeramente la proporción del grano con una mayor concentración de triptófano (es decir, semilla de girasol) probablemente resulte en un perfil mejor. El proceso de fermentación incrementó la digestibilidad de las proteínas de los cereales y las legumbres a niveles más altos (>85%) que los de los cereales y las legumbres molidos o cocidos. Teniendo en cuenta el % de valor diario aportado por una porción RAAC de tempeh, el tempeh de soja calificaría para la declaración de "fuente excelente" de proteína, mientras que el tempeh G-Q-Gir calificaría para la declaración de proteína de "buena fuente" según el marco regulatorio de la FDA de EE.UU (2013)^[6].



6. AGRADECIMIENTOS

Apoyo de la ANII a través del instrumento de Validación Técnica (VT).

7. REFERENCIAS

¹ Olivero-Villanova, A. D., Cordeiro, L., Oliveira, J. B., Ribeiro, J., & Reis, R. (2021). *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 1717-1767.

² Reed, B. (2021). *Journal of Applied Microbiology*, 130(1), 389-405.

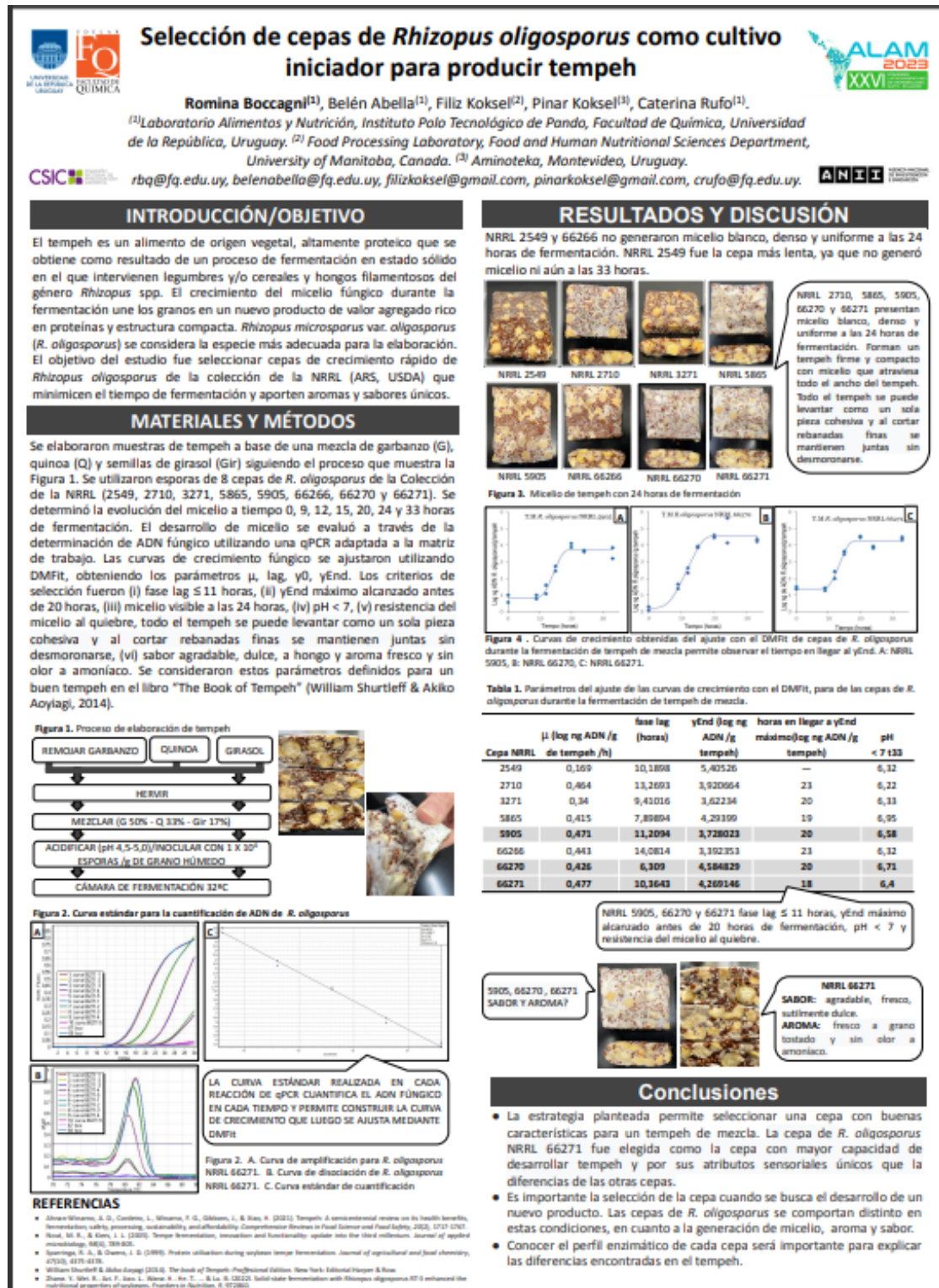
³ Rajaguru, S. (2020). *Extraction, Purification and Characterization of a Pure Protein from Soybeans*. University of Delaware.

⁴ Targui-Berguini et al., 2020. *Food Chemistry*, 308(1), 130-132.

⁵ Newall, G., Do, J., & Channarayana, U. R. (2016). *Food Chemistry*, 208, 47-54.

⁶ Food and Drug Administration (FDA). 2013.

“Selección de cepas de *Rhizopus oligosporus* como cultivo iniciador para producir tempeh”. Presentado en formato póster en el XXVI Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM 2023), realizado los días 23, 24 y 25 de agosto de 2023 en Quito, Ecuador.



“El tempeh como alternativa proteica de alta calidad y aporte a la construcción de un futuro más sustentable” Presentado en formato póster en el Primer Congreso Latinoamericano (CLASS 2023), realizado los días 21 y 22 de noviembre de 2023 en Montevideo, Uruguay.



El tempeh como alternativa proteica de alta calidad y aporte a la construcción de un futuro más sustentable

Alimentos y Nutrición, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.
² Food Processing Laboratory, Food and Human Nutritional Sciences Department, University of Manitoba, Canadá.
³ Aminoteka, Montevideo, Uruguay.

07





Alimentos y Nutrición, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

Romina Boccagni¹ Filiz Köksel² Pinar Köksel³ Belén Abella¹ Caterina Rufo¹

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

El tempeh es un alimento de origen vegetal resultado de un proceso de fermentación en estado sólido de legumbres y/o cereales y hongos del género *Rhizopus* spp. con un alto contenido proteico (40-50% base seca). Durante el proceso de fermentación el crecimiento del micelio fúngico une los granos en un nuevo producto de valor agregado y estructura compacta^[1]. Las fuentes de proteína de origen vegetal generalmente tienen menor digestibilidad y niveles más bajos de aminoácidos esenciales en comparación con las fuentes de proteína de origen animal, lo que afecta su calidad proteica. Sin embargo, la digestibilidad de las proteínas vegetales mejora significativamente mediante el procesamiento^[2], y la mezcla de diferentes fuentes proteicas compensa los aminoácidos limitantes (AAL) en las fuentes individuales logrando un alimento de proteína completa^[3]. Además, las proteínas de origen vegetal son ecológicamente menos intensivas en recursos que las de origen animal en términos de huellas de carbono, uso del agua y de la tierra^[4]. Este estudio tiene como objetivo evaluar la composición nutricional y la calidad de la proteína en 2 tipos de tempeh, uno a base de granos de soja (*R. oryzae*) y otro a base de una mezcla de garbanzos, quinoa y semillas de girasol (G-Q-Gir) (*R. oligosporus*) como alternativa proteica de alta calidad.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

LABORATORIO ALIMENTOS Y NUTRICIÓN, IPTP, URUGUAY

CONDICIONES DE PRODUCCIÓN DE TEMPEH

HUMEDAD DEL GRANO: 40-50% pH del grano 4,5-5
 INÓCULO: 1x10⁶ esporas *Rhizopus* spp/g
 FERMENTACIÓN: 35°C /24hs
 PASTEURIZACIÓN: 80°C / 20 MIN.

COMPOSICIÓN NUTRICIONAL

AQAC Official Method, 2006

FOOD PROCESSING LABORATORY, CANADÁ

CALIDAD PROTEICA

- PUNTUACIÓN DE AMINOÁCIDOS (AMINO ACID SCORES -AAS)
- DIGESTIBILIDAD PROTEICA (DP)




3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

LABORATORIO ALIMENTOS Y NUTRICIÓN, IPTP, URUGUAY

Tabla 1. Valores de proteína en dos variedades de tempeh

Muestra	Proteína (%bs)*	DE** Proteína	Proteína (%bh)***
Soja	40,70	0,87	14,65
G-Q-Gir	20,65	0,02	8,47

*bs: base seca ** DE: Desviación estándar ***bh: base húmeda

Niveles de proteína menores en la mezcla es esperable, ya que las legumbres y los cereales contienen un nivel de proteína menor que el de la soja^[5]

FOOD PROCESSING LABORATORY, CANADÁ

Tabla 2. Puntuaciones de Aminoácidos Esenciales (Amino Acid Scores: AAS)

Muestra	THR	VAL	SAA	ILE	LEU	AAA	HS	LYS	TRP
Soja	1,18	1,41	1,06	1,63	1,19	1,39	1,31	1,08	1,13
G-Q-Gir	1,08	1,37	1,26	1,50	1,06	1,24	1,21	0,94	0,91

Tempeh de soja tuvo el AAS más alto 1,06 mientras que para el Tempeh G-Q-Gir el AAS fue de 0,91 y presentó al triptófano como AAL.

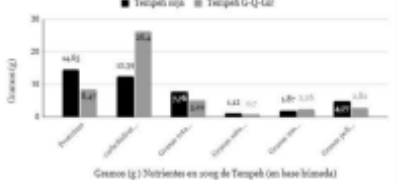
Tabla 3. Valores de Digestibilidad Proteica in vitro (IVPD) y Digestibilidad Proteica in vitro-corregida por score de aminoácidos (IVPDCAAS) en dos variedades de tempeh

Muestra	Proteína (bs)	DP grano*	IVPD**	DE IVPD	IVPDCAAS
Caseína		94 %	0,8		
Soja	40,7	80-85 %	87,3	0,5	0,92
G-Q-Gir	20,65	70-80 %	86,8	0,7	0,79

*Digestibilidad proteína grano cocido sin fermentar (Stone et al., 2019). **IVPD***uso Freyman (2018) Regresión (Digestibilidad verdadera)

Los valores de IVPD obtenidos demuestran que el proceso de fermentación incrementa la digestibilidad de las proteínas de granos, legumbres y cereales

Gráfica 1. Valores de composición nutricional de dos variedades de Tempeh.



Granos (g) Nutrientes en 100g de Tempeh (en base húmeda)

4. CONCLUSIONES

Las dos variedades de tempeh tienen un alto contenido proteico y una buena proporción de macronutrientes. El proceso de fermentación incrementa la digestibilidad de las proteínas de los cereales y las legumbres a niveles más altos que los cereales y las legumbres molidos o cocidos. Teniendo en cuenta el % de valor diario aportado por una porción RAAC de tempeh, el tempeh de soja calificaría para la declaración de proteína de "fuente excelente", mientras que el tempeh G-Q-Gir calificaría para la declaración de proteína de "buena fuente" según el marco regulatorio de la FDA de EEUU (2013)^[7]. A diferencia del tempeh de soja el tempeh de G-Q-Gir presentó el triptófano como AAL, por lo tanto, aumentar ligeramente la proporción del grano con una mayor concentración de triptófano (es decir, semilla de girasol) probablemente resulte en un perfil mejor.

5. REFERENCIAS

^[1] Villaverde, A. S., Cordeiro, L., Wierman, F. G., Gibbons, L., & Khan, R. (2021). Comprehensive Review in Food Science and Food Safety, 2021, 1703-1767.
^[2] Reyes-Rodriguez, M., Reyes-Rodriguez, S. Z., López-Cervantes, L., Múla-Carrillo, J., Jarama-Pérez, G. F., & Reyes-Rodriguez, C. (2020). Physicochemical, nutritional and antioxidant properties of tempeh flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Food Science and Technology International, 34(5), 427-434. <https://doi.org/10.1177/1082013220948709>
^[3] Hwang, M. J., & Kim, J. Y. (2010). Tempeh fermentation, innovation and functionality: Update into the third millennium. Journal of Applied Microbiology, 109(5), 789-805. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2010.01471.x>
^[4] Hurnsley, S., & Wallentin, M. W. (2020). Nutritional water productivity and diets. Agricultural Water Management, 202, 296. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2019.105527>
^[5] Rappaport, S. (2013). Extraction, Purification and Characterization of a Pure Protein from Soybeans. University of Arkansas.
^[6] Freyman, R. et al., 2018. Food Chemistry 258(2), 108-112.
^[7] Food and Drug Administration (FDA) (2013).

6. AGRADECIMIENTOS

AGENCIA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN ANII