

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**



**“DETERMINACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN  
DE GLUCOSINOLATOS DE MASHUA (*Tropaeolum tuberosum*)  
USANDO BACTERIAS LÁCTICAS”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERA EN INDUSTRIAS  
ALIMENTARIAS**

**JOHANA CRISS LINDO RICCE**

**LIMA-PERÚ**

**2021**

---

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación**

**(Art. 24 - Reglamento de Propiedad Intelectual)**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**“DETERMINACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN  
DE GLUCOSINOLATOS DE MASHUA (*Tropaeolum tuberosum*)  
USANDO BACTERIAS LÁCTICAS”**

Presentado por:

**JOHANA CRISS LINDO RICCE**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERA EN INDUSTRIAS  
ALIMENTARIAS

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

.....  
Dr. Marcial I. Silva Jaimes  
PRESIDENTE

.....  
Dr. Luis A. Condezo Hoyos  
MIEMBRO

.....  
*Mg. Sc.* Silvia M. García Torres  
MIEMBRO

.....  
Dra. Ana C. Aguilar Galvez  
ASESORA

.....  
Dra. Rosana S. Chirinos Gallardo  
CO-ASESORA

Lima - Perú

2021

## DEDICATORIA

A mí, porque nunca te diste por vencida y  
lo lograste con mucho esfuerzo y  
dedicación.

A mis padres, que siempre me han apoyado  
en todas las decisiones que he tomado

## AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la Dra. Ana Aguilar Galvez, por brindarme la oportunidad de realizar una tesis en su prestigioso centro de investigación. Le agradezco infinitamente por las enseñanzas, los consejos y la exigencia que atesoraré con mucho cariño y respeto. A mi co-asesora, la Dra. Rosana Chirinos Gallardo, por el apoyo, sugerencias y tiempo. Al Dr. David Campos Gutiérrez, por permitirme formar parte del Instituto de Biotecnología Industrial (IBT) como tesista.

A mi familia, mi madre, que con su amor, paciencia y ejemplo me motivo siempre a seguir adelante. A mi padre, que a pesar de las pocas palabras siempre me demostró lo orgulloso que estaba. A mis hermanos, Mayra, Karen y Erick, que siempre me dieron ánimos cuando más lo necesitaba y por ser mi inspiración. A Minina por su compañía en la etapa de redacción.

A Adelaida y Diego por sus enseñanzas y disposición durante la parte experimental.

A Andrés que siempre me aconsejo y apoyo en todo lo que necesitaba. A Karolina, Mirtha, Marianella, Paola y Daniel, porque siempre nos motivamos durante la ejecución de nuestras tesis.

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico, y de Innovación Tecnológica-FONDECYT, por el financiamiento para el desarrollo de la presente investigación como parte del proyecto: “Síntesis de tiocianatos, nitrilos, epitionitrilos y otros con potencial anticancerígeno a partir de los glucosinolatos de mashua (*Tropaeolum tuberosum*), usando bacterias lácticas” (Convenio de Subvención N° 111-2018-FONDECYT).

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

**ABSTRACT**

|  |    |
|--|----|
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b> -----   | 1  |
| <b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> -----                                | 3  |
| 2.1. MASHUA-----   | 3  |
| 2.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES-----                                  | 3  |
| 2.1.2. TAXONOMÍA-----  | 4  |
| 2.1.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y VARIEDADES-----                  | 4  |
| 2.1.4. COMPOSICIÓN-----  | 5  |
| 2.1.5. USOS EN MEDICINA TRADICIONAL-----                               | 6  |
| 2.1.6. PRODUCCIÓN NACIONAL-----  | 7  |
| 2.2. ESTRÉS ABIÓTICO POST COSECHA-----                                 | 9  |
| 2.3. LOS GLUCOSINOLATOS-----   | 10 |
| 2.3.1. ESTRUCTURA-----   | 10 |
| 2.3.2. CLASIFICACIÓN Y TIPOS DE GLUCOSINOLATOS-----                    | 11 |
| 2.3.3. SÍNTESIS DE LOS GLUCOSINOLATOS-----                             | 13 |
| 2.4. PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN-----                                  | 15 |
| 2.4.1. ISOTIOCIANATOS-----   | 16 |
| 2.4.2. OTROS PRODUCTOS DE LA TRANSFORMACIÓN DE GLUCOSINOLATOS<br>----- | 17 |
| 2.5. MIROSINASA-----   | 18 |
| 2.5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES-----                                  | 18 |
| 2.5.2. MECANISMO DE LA MIROSINASA-----                                 | 20 |
| 2.6. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS-----                                     | 21 |
| 2.6.1. GENERALIDADES-----  | 21 |
| 2.6.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS-----                  | 22 |
| <b>III. METODOLOGÍA</b> -----  | 24 |
| 3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN-----   | 24 |
| 3.2. MATERIA PRIMA-----  | 24 |
| 3.3. BACTERIAS LÁCTICAS-----   | 24 |
| 3.4. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS-----                              | 25 |

|   |    |
|---|----|
| 3.4.1. MATERIALES   | 25 |
| 3.4.2. REACTIVOS  | 25 |
| 3.4.3. EQUIPOS  | 26 |
| 3.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS  | 27 |
| 3.5.1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y MATERIA SECA  | 27 |
| 3.5.2. DETERMINACIÓN DE pH  | 27 |
| 3.5.3. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ISOTIOCIANATOS Y AMINAS   | 27 |
| 3.5.4. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSINOLATOS  | 28 |
| 3.5.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MIROSINASA   | 29 |
| 3.5.6. CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSINOLATOS EN EL CULTIVO BACTERIANO  | 30 |
| 3.5.7. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DERIVADOS DE GLUCOSINOLATO DURANTE LA FERMENTACIÓN CON BACTERIAS LÁCTICAS | 31 |
| 3.5.8. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS   | 32 |
| 3.6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL   | 32 |
| 3.6.1. OBTENCIÓN DE HARINA DE MASHUA  | 32 |
| 3.6.2. ACONDICIONAMIENTO Y CULTIVO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS  | 34 |
| 3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL  | 34 |
| 3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO   | 36 |
| <b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>   | 37 |
| 4.1. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS ABIÓTICO POST-COSECHA DE MASHUA A CONDICIONES CONTROLADAS                                | 37 |
| 4.1.1. EFECTO DEL ESTRÉS ABIÓTICO POST-COSECHA SOBRE LOS GLUCOSINOLATOS   | 37 |
| 4.1.2. EFECTO DEL ESTRÉS ABIÓTICO POST-COSECHA SOBRE LA ACTIVIDAD MIROSINASA Y GLUCOSINOLATOS TOTALES               | 40 |
| 4.1.3. EFECTO DEL ESTRÉS ABIÓTICO POST-COSECHA SOBRE LOS PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN DE LOS GLUCOSINOLATOS          | 42 |
| 4.2. FERMENTACIÓN DE GLUCOSINOLATO DE MASHUA POR ACCIÓN DE LA MIROSINASA DE BACTERIAS LÁCTICAS                      | 45 |
| 4.2.1. EVALUACIÓN DE GLUCOSINOLATOS DE MASHUA EN MEDIOS DE CULTIVO  | 45 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.2.2. EVALUACIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN DE GLUCOSINOLATOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS LÁCTICAS-----   | 50  |
| 4.3. EVALUACIÓN DE LA FERMENTACIÓN DE GLUCOSINOLATOS DE MASHUA EN PRESENCIA DE <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG-----                               | 52  |
| 4.3.1. EVALUACIÓN DEL CONSUMO GLUCOSINOLATOS CON <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG DURANTE LA FERMENTACIÓN -----                                    | 52  |
| 4.3.2. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG EN MEDIOS DE CULTIVOS CON GLUCOSINOLATOS DURANTE LA FERMENTACIÓN-----        | 55  |
| 4.3.3. DETERMINACIÓN DEL pH DE MEDIOS DE CULTIVO CON <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG EN PRESENCIA DE GLUCOSINOLATOS DURANTE LA FERMENTACIÓN ----- | 57  |
| 4.3.4. EVALUACIÓN DE LOS DERIVADOS DE LOS GLUCOSINOLATOS EN MEDIOS DE CULTIVO CON <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG DURANTE LA FERMENTACIÓN -----   | 59  |
| <b>V. CONCLUSIONES</b> -----  | 65  |
| <b>VI. RECOMENDACIONES</b> -----  | 66  |
| <b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> -----  | 67  |
| <b>VIII. ANEXOS</b> -----   | 105 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1: Composición de química de la mashua en base húmeda.....  | 6  |
| Tabla 2: Clasificación de algunos glucosinolatos en base a la estructura de la cadena R...  | 12 |
| Tabla 3: Producto de ITC o NIT esperado de la hidrólisis de GLS catalizada por la mirosinasa vegetal.....   | 18 |
| Tabla 4: Contenido de glucosinolatos en mashua almacenados en condiciones controladas durante 12 días.....  | 38 |
| Tabla 5: Productos de la transformación de glucosinolatos de la mashua almacenados durante 12 días en refrigeración .....                                     | 43 |
| Tabla 6: Porcentaje de consumo de glucosinolatos, recuento microbiano y pH después de la fermentación de glucosinolatos obtenidos a partir de la mashua ..... | 47 |
| Tabla 7: Productos de la transformación de glucosinolatos producidos por bacterias lácticas .....   | 50 |
| Tabla 8: Porcentaje de consumo de glucosinolatos de mashua con <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG durante la fermentación .....                                | 53 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Producción nacional de mashua.....   | 8  |
| Figura 2: Departamentos con mayor producción mensual de mashua en el 2018 .....  | 8  |
| Figura 3: Estructura del glucosinolato.....  | 11 |
| Figura 4: Esquema de la biosíntesis de los glucosinolatos.....   | 14 |
| Figura 5: Hidrólisis de glucosinolatos bajo diferentes condiciones .....   | 16 |
| Figura 6: Mecanismo de reacción catalizada por mirosinasa en presencia de ácido ascórbico .....  | 21 |
| Figura 7: Diseño experimental para el estudio de la fermentación de glucosinolatos de mashua ( <i>Tropaeolum tuberosum</i> ) con bacterias lácticas.....   | 35 |
| Figura 8: Contenido de glucosinolatos ( $\mu\text{mol/g}$ bs) y actividad mirosinasa (U/g, bs) de las muestras de mashua almacenadas durante 12 días en refrigeración.....   | 40 |
| Figura 9: Curvas de crecimiento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG en medios de cultivo con glucosinolatos (0.01, 0.05 y 0.1 %) durante la fermentación .....  | 55 |
| Figura 10: Recuento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG incubado en medios de cultivo con glucosinolatos (0.01, 0.05 y 0.1 %) durante la fermentación .....   | 57 |
| Figura 11: Determinación del pH durante la fermentación de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG incubado en 0.01, 0.05 y 0.1 % de GLS .....   | 58 |
| Figura 12: 4-Metoxibencil isotiocianato generado a partir del metabolismo de la <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG en presencia de glucosinolato de mashua a 0.01, 0.05 y 0.1 por ciento de concentración durante la fermentación ..... | 60 |
| Figura 13: 4-Metoxibenceno acetonitrilo generado a partir del metabolismo de la <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG en presencia de glucosinolato de mashua a 0.01, 0.05 y 0.1 por ciento de concentración .....                         | 61 |
| Figura 14: (4-Metoxibencilalcohol) metil éter generado a partir del metabolismo de la <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG en presencia de glucosinolato de mashua a 0.05 y 0.1 por ciento de concentración .....                         | 62 |
| Figura 15: Benceno acetaldehído generado a partir del metabolismo de la <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG en presencia de GLS de mashua a 0.01, 0.05 y 0.1 por ciento de concentración.....  | 63 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|   |     |
|---|-----|
| ANEXO 1: ANALISIS ESTADÍSTICO HUMEDAD DE LA HARINA DE MASHUA  | 105 |
| ANEXO 2: CROMATOGRAMA DE LOS GLUCOSINOLATOS OBTENIDO POR UPLC®-PDA (229NM) DE MASHUA ALMACENADA A DIFERENTES TIEMPOS                      | 106 |
| ANEXO 3:ANÁLISIS ESTADÍSTICO CONTENIDO DE GLUCOSINOLATOS TOTALES .....  | 107 |
| ANEXO 4:ANÁLISIS ESTADÍSTICO CONTENIDO DE GLUCOUBRIETINA .....  | 108 |
| ANEXO 5:ANÁLISIS ESTADÍSTICO CONTENIDO DE GLUCOSINALBINA .....  | 108 |
| ANEXO 6: ANÁLISIS ESTADÍSTICO CONTENIDO DE GLUCOTROPAEOLINA..   | 109 |
| ANEXO 7:ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD MIROSINASA .....   | 110 |
| ANEXO 8: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL 4 METOXI-BENCIL ISOTIOCIANATO DE LA MASHUA .....  | 111 |
| ANEXO 9: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL 4-METOXIBENCENO-ACETONITRILLO DE LA MASHUA .....  | 112 |
| ANEXO 10: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL (4-METOXIBENCILALCOHOL) METIL ÉTER DE LA MASHUA .....  | 113 |
| ANEXO 11: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL BENCIL ISOTIOCIANATO DE LA MASHUA.....   | 114 |
| ANEXO 12: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL BENCENO ACETALDEHIDO DE LA MASHUA.....   | 115 |
| ANEXO 13: CROMATOGRAMA Y ESPECTROS DE MASA OBTENIDOS POR CG-MS DE LOS DERIVADOS DE GLUCOSINOLATOS DE MASHUA .....                         | 116 |
| ANEXO 14: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DEL CONSUMO DE GLUCOUBRIETINA DESPUÉS DE LA FERMENTACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS.....         | 117 |
| ANEXO 15: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DEL CONSUMO DE GLUCOSINOLATOS TOTALES DESPUÉS DE LA FERMENTACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS..... | 118 |
| ANEXO 16: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL RECUENTO MICROBIANO OBTENIDO DESPUÉS DE LA FERMENTACIÓN DE GLUCOSINOLATOS POR BACTERIAS LÁCTICAS.....  | 119 |

|  |     |
|--|-----|
| ANEXO 17: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE pH DESPUÉS DE LA FERMENTACIÓN DE GLUCOSINOLATOS POR BACTERIAS LÁCTICAS.....                            | 119 |
| ANEXO 18: CROMATOGRAMA Y ESPECTROS DE MASA OBTENIDOS POR CG-MS DESPUÉS DE LA FERMENTACIÓN DE GLUCOSINOLATOS POR BACTERIAS LÁCTICAS.....  | 120 |
| ANEXO 19: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE 4-METOXIBENCIL ISOTIOCIANATO PRODUCIDO POR BACTERIAS LÁCTICAS .....                                    | 121 |
| ANEXO 20: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL 4-METOXIBENCENO ACETONITRILO PRODUCIDO POR BACTERIAS LÁCTICAS .....                                   | 121 |
| ANEXO 21. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL (4-METOXIBENCILALCOHOL) METIL ÉTER PRODUCIDO POR BACTERIAS LÁCTICAS .....                             | 122 |
| ANEXO 22: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL BENCENO ACETALDEHÍDO PRODUCIDO POR BACTERIAS LÁCTICAS .....   | 123 |
| ANEXO 23: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PORCENTAJE DEL CONSUMO DE GLUCOSINOLATO DE LA MASHUA A PARTIR DEL <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ..... | 124 |
| ANEXO 24: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DENSIDAD ÓPTICA DE <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG EN MEDIO DE CULTIVOS CON GLUCOSINOLATOS.....   | 126 |
| ANEXO 25: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RECUENTO MICROBIANO DE <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG EN MEDIO DE CULTIVOS CON GLUCOSINOLATOS ..... | 129 |
| ANEXO 26: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PH DEL MEDIO DE CULTIVO DE <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG EN PRESENCIA DE GLUCOSINOLATOS.....      | 131 |
| ANEXO 27: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL 4-METOXIBENCIL ISOTIOCIANATO PRODUCIDO POR <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.....                     | 134 |
| ANEXO 28: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL 4-METOXIBENCENO ACETONITRILO PRODUCIDO POR <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.....                     | 137 |
| ANEXO 29: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL (4-METOXIBENCILALCOHOL) METIL ÉTER PRODUCIDO POR <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.....               | 139 |
| ANEXO 30: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL BENCENO ACETALDEHÍDO PRODUCIDO POR <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.....                             | 141 |

## RESUMEN

La mashua (*Tropaeolum tuberosum*) es un tubérculo conocido por sus metabolitos secundarios entre los que se encuentran los glucosinolatos (GLS). Los GLS por acción de la mirosinasa vegetal se transforman en diversos productos con propiedades funcionales en beneficio para la salud entre ellas las anticancerígenas. Por otro lado, se conoce que ciertas bacterias lácticas pueden metabolizar los GLS y transformarlos en sus derivados. El objetivo de esta investigación fue estudiar la fermentación de los GLS de la mashua usando seis cepas de bacterias lácticas, para ello se empleó tubérculos que, luego de ser almacenados hasta por doce días bajo condiciones controladas (12 °C, 80 % HR), presentaron el más alto contenido de GLS. De las seis bacterias evaluadas se seleccionó aquella que mostró mayor consumo de GLS para estudiar la fermentación a diferentes concentraciones de GLS. Los resultados muestran que para el día diez de almacenamiento hubo un incremento significativo (56%) de GLS respecto al día cosecha. De las seis bacterias lácticas estudiadas, los *Enterococcus* (*E. faecium*, *E. mundtii*), *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*) y *Bifidobacterium* (*B. bifidum*) consumieron en promedio 13.8, 32.7 y 36.3 por ciento de GLS y los derivados de GLS obtenidos fueron 4-Metoxibencil isotiocianato, 4-Metoxibenceno acetonitrilo, (4-Metoxibencil alcohol) metil éter y Benceno acetaldehído; el *L. rhamnosus* fue seleccionado por su mayor consumo de GLS y mayor producción de derivados de GLS. La evaluación de la fermentación de *L. rhamnosus*, con 0.1 por ciento de GLS en el medio de cultivo, mostró un consumo de 45 por ciento de GLS a las 54 h y mayor producción de sus derivados. En base a los resultados podemos indicar que, bacterias probióticas como *L. rhamnosus*, *B. bifidum* y *L. casei*, que podrían estar colonizando el tracto gastrointestinal humano, serían capaces de utilizar los glucosinolatos intactos provenientes de mashua y ser aprovechados en beneficio del consumidor.

**Palabras clave:** glucosinolatos, mashua, derivados de glucosinolatos, bacterias lácticas.

## ABSTRACT

Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) is a tuber known for its secondary metabolites which include glucosinolates (GLS). When the GLSs are transformed by the action of plant myrosinase into various derivatives that possess functional properties are formed. Likewise, certain lactic acid bacteria can metabolize GLSs and transform them into their derivatives. However, little is known about the ability of bacteria to metabolize mashua GLS. The aim of this work was to study the fermentation of mashua GLSs using lactic acid bacteria. Firstly, the day of highest GLS content during post-harvest storage was determined. The ability to consume GLS was evaluated on six strains of lactic acid bacteria. Then, the one that showed the highest consumption was selected for fermentation assays at different GLS concentrations. The results show an increase (56%) of GLS on day 10 of storage with respect to the harvest day. Of the six lactic acid bacteria, *Enterococcus* (*E. faecium*, *E. mundtii*), *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*) and *Bifidobacterium* (*B. bifidum*) consumed on average 13.8, 32.7 and 36.3 percent GLS and the GLS derivatives obtained were 4-Methoxybenzyl isothiocyanate, 4-Methoxybenzene acetonitrile, (4-Methoxybenzyl alcohol) methyl ether and Benzene acetaldehyde. The evaluation of the fermentation of *L. rhamnosus*, with 0.1 percent GLS in the culture medium, showed a consumption of 45 percent GLS at 54 h and higher production of derivatives. From the results we can indicate that probiotic bacteria such as *L. rhamnosus*, *B. bifidum* and *L. casei*, which could colonize the human gastrointestinal tract, would be able to utilize intact glucosinolates from mashua and be used for the benefit of the consumer.

Key words: glucosinolates, mashua, glucosinolate derivatives, lactic acid bacteria.

## I. INTRODUCCIÓN

La mashua es un tubérculo nativo del género *Tropaeolum*, el cual crece en los Andes, del Perú y otros países. Se cultiva artesanalmente y entre sus usos está el ser empleado como pesticida (control biológico) en pequeñas parcelas junto a otros tubérculos para el autoconsumo. Esta raíz tuberosa ha sido tema de investigación en estos últimos años, debido al gran valor nutricional que posee; así mismo, por la gran variedad de compuestos bioactivos encontrados, tales como los polifenoles (Chirinos *et al.*, 2008), antocianinas, carotenoides (Alcalde-Eon, *et al.*, 2004; Chirinos *et al.*, 2006) y glucosinolatos (GLS) (Ramallo *et al.*, 2004). La importancia de este último compuesto se debe a las grandes cantidades reportadas en comparación con otros vegetales como la coliflor, brócoli, maca (Kapusta-Duch *et al.*, 2016; Yábar *et al.*, 2011), entre otros.

Los GLS se almacenan en la vacuola de la planta separado de la enzima endógena mirosinasa (Kissen & Bones, 2009). Tras la ruptura celular, la mirosinasa reacciona con los GLS, iniciando a la transformación enzimática, lo que da como resultado diferentes derivados entre ellos el tiocianato que ha mostrado actividad anticancerígena en las células cancerosas del colon y próstata (Noratto *et al.*, 2004). Generalmente, estos tubérculos son sometidos a procesos de cocción que ocasionan la inactivación de la mirosinasa. Barba *et al.* (2016) mencionan que los GLS podrían llegar intactos al colon donde se metabolizan por enzimas bacterianas obteniendo los derivados de GLS durante la fermentación luego del consumo de vegetales crucíferos cocidos.

En estudios con células y animales, se ha evidenciado que los derivados de los GLS de las plantas de *Brassicaceae* pueden ejercer efectos positivos para la salud (International Agency for Research on Cancer, 2004). Además, se ha demostrado que son productos bioactivos importantes en la dieta y posibles herramientas terapéuticas (Johnson 2004 y Johnson 2007). Existen estudios sobre los derivados de la fermentación que se obtienen a través de las

bacterias con los GLS provenientes de harina de colza (Nugon-Baudon *et al.*, 1990 y Luciano *et al.*, 2011), tallos de capuchina (*Tropaeolum majus*) (Cheng *et al.*, 2004) y semillas de berro (*Lepidium sativum*) (Luang-In *et al.*, 2014; Luang-In *et al.*, 2016), semillas de berro de tierra (*Barbarea verna*) (Luang-In *et al.*, 2016), brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*) (Ye *et al.*, 2019 y Wu *et al.*, 2019) Sin embargo, en la actualidad, no existen estudios sobre los derivados de la fermentación originados por la acción de bacterias lácticas a partir de GLS de mashua.

Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue estudiar la fermentación de los glucosinolatos mashua (*Tropaeolum tuberosum*) usando bacterias lácticas. Para ello se plantearon las siguientes etapas: 1) Evaluar y cuantificar los glucosinolatos de la mashua y sus derivados, almacenados durante doce días en condiciones controladas (12 °C, 80 %HR); seleccionándose el día de almacenamiento donde se encontró el mayor contenido de glucosinolatos, los mismos que fueron extraídos para las siguientes etapas; 2) Evaluar y cuantificar los glucosinolatos de mashua y sus derivados durante la fermentación con seis bacterias lácticas: *Enterococcus faecium* CWBI-B1430, *Enterococcus mundtii* CWBI-B1431, *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496, *Lactobacillus casei* subsp *casei* NRRL B-1922, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium bifidum* BIOSTAR®; la bacteria que consumió la mayor cantidad de glucosinolatos fue seleccionada para la siguiente etapa; y 3) Evaluar la fermentación de glucosinolatos de la mashua a diferentes concentraciones y tiempos, con la bacteria seleccionada de la etapa anterior, a través del consumo de glucosinolatos y sus derivados.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. MASHUA

#### 2.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

La mashua (*Tropaeolum tuberosum*), conocida como isaño (Aymara-Bolivia), cubio (Colombia), año e isaño (quechua en Perú y Bolivia), es un tubérculo comestible que crece en la región andina (Grau *et al.*;2003 y Hernández y León 1994 citados por Ortega *et al.*, 2006), y es considerado como fuente de compuestos bioactivos con propiedades funcionales (Grau *et al.*, 2003; Lim, 2016).

La mashua aparentemente se originó en los Andes centrales (latitud 10 ° a 20 °S) (Arbizu y Tapia, 1994), y crece entre 2400 y 4300 m altitud (Flores *et al.*, 2003). Se cultiva en los Andes de Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela (Gibbs *et al.*, 1978), norte de Argentina y Chile (Arbizu y Tapia, 1994). Dentro de los tubérculos más conocidos, la mashua se encuentra en el cuarto lugar de importancia en la región andina precedida por la papa, oca y olluco (National Research Council, 1989).

En el género *Tropaeolum* los principales metabolitos secundarios son los glucosinolatos (GLS). Estos compuestos y sus metabolitos biológicamente activos pueden ser responsables de los usos medicinales y los usos en la agricultura orgánica (Johns *et al.*, 1982). El cultivo de este tubérculo es poco popular por su amargor, es por ello que, en Bolivia y en algunas partes de Perú, los tubérculos se recubren con melaza y se congelan para hacer un postre especial (National Research Council, 1989). También se exponen al sol para mejorar el sabor, incrementando el dulzor y por ende disminuir el amargor del tubérculo (Tapia *et al.*, 2007).



### 2.1.2. TAXONOMÍA

Según el sistema de Artur Cronquist, citado por Pacheco (2015), la Mashua tiene la siguiente clasificación taxonómica.

|          |  |
|----------|--|
| Reino    | : Vegetal                                  |
| División | : Angiospermas                             |
| Clase    | : Dicotiledóneas                           |
| Subclase | : Rosidae                                  |
| Orden    | : Geraniales                               |
| Familia  | : Tropaeolaceae                            |
| Género   | : Tropaeolum                               |
| Especie  | : <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pavón |

### 2.1.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y VARIEDADES

La mashua es una planta herbácea perenne, tendida o trepadora, que ocasionalmente alcanza de 2 a más metros de altura (Grau *et al.*, 2003). Tiene tallos aéreos, cilíndricos y ramificados de color púrpura. Sus hojas son de color verde oscuro en el haz y verde claro en el envés. Las flores son anaranjadas o rojizas dependiendo de la variedad y el entorno (Hernández & León, 1994).

En los estolones axiales se producen los tubérculos, estos son alargados, cónicos o elipsoides con superficie cerosa. Además, en el cuerpo rugoso presentan surcos, del cual se pueden producir tallos y raíces (Lim, 2016). Los tubérculos presentan una gran diversidad en la morfología y color, que varía desde la crema y el violeta oscuro (Chirinos *et al.*, 2008), pasando por amarillo, naranja, purpura y café (Zambrano, 2004).

El Instituto de Desarrollo y Medio Ambiente menciona que en la región de Huánuco en el distrito de Quisqui se ha registrado alta diversidad de especies y variedades de tubérculos nativos y locales (Mejía, 2016). En el caso de la mashua se ha reportado 129 variedades. Por otro lado, el Centro Internacional de la Papa (CIP) citado por Manrique *et al.* (2013)

menciona que conserva 113 accesiones de mashua, que han sido recolectadas de las diferentes comunidades campesinas del Perú, Bolivia y Argentina.

#### **2.1.4. COMPOSICIÓN**

El contenido de agua en los tubérculos de mashua es relativamente alto, en un rango de 79 a 94 por ciento (Grau *et al.*, 2003). Con respecto a los carbohidratos, almidón, proteínas, grasas y contenido de fibra de 69.7 a 85.8, 41.35, 6.9 a 15.7, 0.1 a 1.0 y 4.8 a 8.6 por ciento en base seca y un contenido total de azúcar de 27.7 por ciento en base seca. (Gross *et al.*, 1989; King & Gershoff, 1987 ; Valcárcel-Yamani *et al.* 2013). Según Leidi *et al.* (2018) mencionan que el alto contenido de carbohidratos y almidón varía por factores como el genotipo, las condiciones de crecimiento, la madurez en el momento de la cosecha y el tratamiento post-cosecha.

El contenido de proteína de la mashua es alto, en comparación al de la oca y el olluco (Valcárcel-Yamani *et al.*, 2013). Según King & Gershoff (1987), al estudiar diferentes muestras de mashua, determinó que el porcentaje de proteína en estas puede variar de 6.9 a 15.7 por ciento en base seca. La mashua contiene todos los aminoácidos esenciales (mg / g de proteína): lisina 35–41, treonina 22–24, valina 25–46, isoleucina 25–37, leucina 35–43, fenilalanina + tirosina 14 –37, triptófano 4.7–5.3 y metionina + cisteína 12–15 (National Research Council [NRC], citado por Lim, 2016).

El tubérculo de mashua muestra una composición nutricional satisfactoria en comparación con las recomendaciones de la organización mundial de la salud (OMS) (Shah *et al.*, 2001, citados por Grau *et al.*, 2003). Con respecto a la vitamina C y pro vitamina A se mostraron en estudios comparativos con otros cultivos de raíces o tubérculos andinos (arracacha, melloco, miso, oca, yacón), que la mashua presentaba la mayor concentración de estos nutrientes (Espín *et al.*, 2001). Con respecto a la vitamina C, se reportaron valores de 480 mg/100 g (bs) o 77.5 mg/100 g (bh) (Collazos *et al.*, 1996; Sperling & King, 1990). En la Tabla 1 se muestra la composición química de la mashua en base húmeda según diferentes investigadores.

**Tabla 1: Composición de química de la mashua en base húmeda**

| Componente            | Unidades | Espin <i>et al.</i><br>(2001) | Reyes <i>et al.</i><br>(2009) | Valcárcel-<br>Yamani <i>et al.</i><br>(2013) |
|-----------------------|----------|-------------------------------|-------------------------------|--|
| Humedad               | g        | 88.70                         | 87.4                          | 90.84  |
| Proteínas             | g        | 1.03                          | 1.5                           | 0.84   |
| Grasa                 | g        | 0.52                          | 0.7                           | 0.084  |
| Carbohidratos totales | g        | 8.52                          | 9.8                           | 6.32   |
| Fibra cruda           | g        | 0.67                          | 0.9                           | 1.43   |
| Cenizas               | g        | 0.54                          | 0.6                           | 0.47   |
| Calcio                | mg       | 0.68                          | 12                            | -  |
| Fósforo               | mg       | 36.16                         | 29                            | -  |
| Hierro                | mg       | -                             | 1.00                          | -  |
| Tiamina               | mg       | -                             | 0.10                          | -  |
| Riboflavina           | mg       | -                             | 0.12                          | -  |
| Niacina               | mg       | -                             | 0.67                          | -  |
| Vitamina C            | mg       | 77.37                         | 77.50                         | -  |

FUENTE: Espín *et al.* (2001), Reyes *et al.* (2009) y Valcárcel-Yamani *et al.* (2013)

### 2.1.5. USOS EN MEDICINA TRADICIONAL

En la medicina popular, la mashua es muy conocida por sus efectos beneficiosos en el hígado, los riñones, para aliviar los trastornos urinarios de la próstata y se considera un agente diurético (Johns *et al.*, 1982). Además, se consume para tratar las úlceras cutáneas, la diabetes, el dengue y la fiebre de la malaria y la recuperación postparto (National Research Council 1989 citados por Taylor 2009).

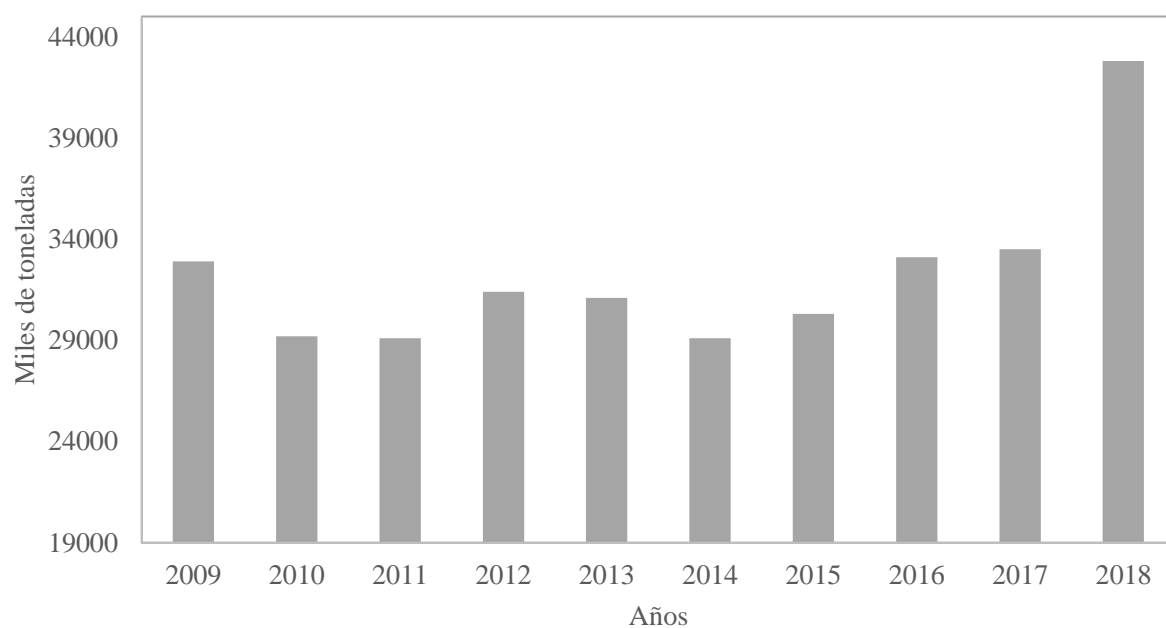
En Bolivia, se cree que la mashua induce la menstruación y se emplea en la medicina popular como emenagogo (Johns *et al.*, 1982). Este tubérculo es conocido por reducir la función reproductiva en los hombres (Cárdenas-Valencia *et al.*, 2008). Es decir, se le atribuye el antilibido (Roca & Manrique, 2005). Es por ello, que muchos hombres andinos se niegan a consumir la mashua, debido a que es considerado como un anafrodisíaco.

#### **2.1.6. PRODUCCIÓN NACIONAL**

En los últimos años el índice de la producción nacional agropecuaria registró un aumento de 2.38 por ciento con respecto al 2019, debido a mayor producción agrícola). En el sector agrícola los cultivos que registraron mayores volúmenes de producción son los tubérculos, agroindustriales, frutas, hortalizas, cereales y legumbres (Instituto Nacional de Estadística e Informática, 2020). Dentro de los tubérculos, según el Sistema integrado de estadísticas agrarias (Ministerio de Agricultura y Riego, 2018) reporta que la mayor producción de raíces y tubérculos comestibles en toneladas métricas a nivel nacional es la papa, seguido de la yuca, camote, pituca, maca, arracacha, oca, mashua y olluco. Con respecto, a la mashua en la Figura 1 se muestra la producción nacional a partir del año 2009 a 2018.

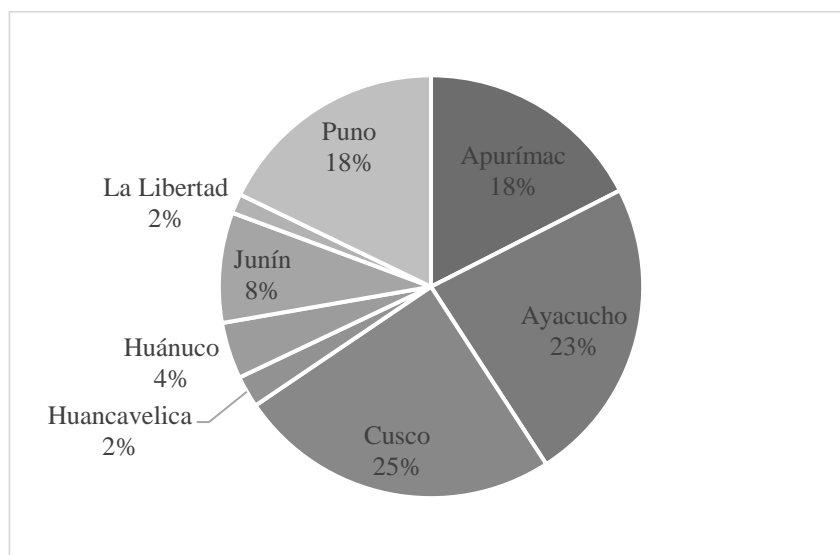
El aporte al comercio nacional mensual de mashua (42877 tn) es superior a la arracacha (23574 tn) que es para autoconsumo (Ministerio de Agricultura y Riego, 2018). Según Trivelli & Smith (1997) su producción es solo de importancia local, por lo que se le denomina, grupo de cultivo menor. Sin embargo, en estos últimos años se ha mostrado un incremento en la producción nacional de este tubérculo específicamente del 2017 al 2018 como se puede observar en la Figura 1.

Según National Research Council (1989) en el Perú, los departamentos donde se cultivan estos tubérculos son: Cajamarca, Cerro de Pasco, Ancash, Lima, Junín, Huancavelica, Ayacucho, Apurímac, Cusco, Arequipa, Puno y Tacna; encontrándose con mayor frecuencia en el centro y el sur del Perú. Sin embargo, del 2018 los departamentos que producen más de estos tubérculos son Cusco (25 por ciento), Ayacucho (23 por ciento) y Puno (18 por ciento). En el 2018 el Ministerio de Agricultura y Riego reportó la mayor producción mensual de mashua en los departamentos de Cusco (10,485 tn), Ayacucho (9,946 tn) y Puno (7,579 por ciento) (Figura 2).



**Figura 1: Producción nacional de mashua**

FUENTE: Adaptado del Ministerio de Agricultura y Riego (2018)



**Figura 2: Departamentos con mayor producción mensual de mashua en el 2018**

FUENTE: Adaptado por Ministerio de Agricultura y Riego (2018)

## 2.2. ESTRÉS ABIÓTICO POST COSECHA

El estrés es la condición fisiológica alterada en las plantas causada por diferentes factores que modifican su equilibrio bioquímico (Gaspar *et al.*, 2002). El estrés abiótico es una condición que reduce el crecimiento y el rendimiento por debajo de los niveles óptimos (Cramer *et al.*, 2011). El punto más importante y común en las plantas expuestas al estrés abiótico es una disminución en la producción de energía y/o un aumento de la demanda de energía para superar el estrés (Duque *et al.*, 2013).

El estrés abiótico se debe a varios factores ambientales que pueden ser previos a la cosecha, como, por ejemplo: falta de agua, luz, temperatura de campo (Ferguson *et al.*, 1999; Toivonen & Hodges, 2011). También se debe a otros factores como la salinidad (Yadav *et al.*, 2016), metales tóxicos (Seneviratne *et al.*, 2019) y deficiencia de nutrientes (Gupta *et al.*, 2018). Entre estos factores, la temperatura, la luz y la disponibilidad de agua son las causas principales de los trastornos durante el manejo de los productos antes y después de la cosecha (Toivonen & Hodges, 2011). Para hacer frente a estos factores, las plantas pueden establecer varios mecanismos mediante los cuales pueden aumentar su tolerancia a través de adaptaciones físicas y cambios moleculares y celulares (Knight & Knight, 2001).

Estos factores estimulan a las plantas a sintetizar diversos metabolitos (Yang *et al.*, 2018); muchos de estos se producen a través de vías metabólicas que son de gran importancia en el desarrollo de las plantas (Piasecka *et al.*, 2019); como, por ejemplo, la redirección del metabolismo hacia la biosíntesis de compuestos protectores ante el estrés, como fenilpropanoides, compuestos fenólicos (Ramakrishna & Aswathanarayana, 2011), los poliprenoides, carotenoides, GLS (Singh *et al.*, 2019), entre otros. Así los factores abióticos tienen diferentes aplicaciones, como las mejoras en la producción de fitoquímicos (Ramakrishna & Aswathanarayana, 2011).

Con respecto a los GLS, según Martínez-Ballesta *et al.* (2013) menciona que una serie de condiciones ambientales tales como temperatura, luz, salinidad, deficiencias nutricionales pueden mejorar significativamente el contenido de GLS. Asimismo, Di Gioia *et al.* (2020) menciona que las condiciones climáticas, como la radiación solar, el proceso fotosintético, la temperatura y la humedad relativa, contribuyen simultáneamente a determinar la síntesis

y el metabolismo y, por tanto, la acumulación de GLS. En el caso de Yadav *et al.* (2016), demostraron que, en condiciones de estrés abiótico, se producía dos tipos de GLS, alifático e indólico, en diferentes zonas del tejido vegetal de *Arabidopsis thaliana*.

Por otro lado, Kissen *et al.* (2016) analizaron el efecto de la temperatura en múltiples accesiones de *Arabidopsis thaliana*, indicando que en la mayoría de las accesiones sometidas a temperaturas moderadas de enfriamiento de 15 a 9 °C se generaron niveles más altos de GLS, especialmente los de tipo alifático. En otros estudios, autores como Charron & Sams (2004) y Pereira *et al.* (2002), observaron que las temperaturas bajas (11-15°C) o altas (32-33°C), mejoraron el contenido de GLS en comparación con temperaturas moderadas (18-22°C). En el caso de la maca cosechada en condiciones ambientales de 10 a 15 °C a 70-90% de humedad relativa, se observó un aumento gradual y significativamente de GLS (Yábar *et al.*, 2011). Así mismo, Lee *et al.* (2017) y Lim *et al.* (2015) reportaron que en muestras de rábano sometidos a una temperatura de almacenamiento de 0 °C, y humedad relativa de 80-90% se observó un incremento de GLS, lo que sugiere que la biosíntesis de los GLS es estimulada por tensiones térmicas y presión de saturación.

Villarreal-García *et al.* (2016) señalaron que los factores como la temperatura de almacenamiento que causan estrés desencadenan la activación del metabolismo secundario del brócoli incrementando el contenido de GLS. Se ha demostrado que la aplicación de estrés previa a la cosecha genera un aumento en la concentración de GL totales en los brotes de brócoli (Ku *et al.*, 2013). También se ha mostrado un aumento en la concentración de GLS en la mashua (Campos *et al.*, 2019).

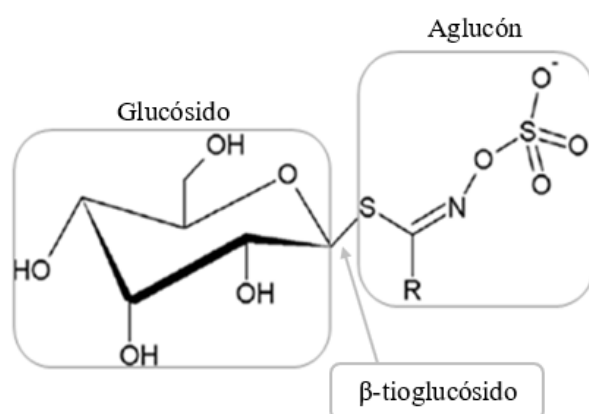
## **2.3. LOS GLUCOSINOLATOS**

### **2.3.1. ESTRUCTURA**

Los glucosinolatos (GLS) son metabolitos secundarios aniónicos azufrados (Clarke, 2010). Se encuentran en las familias botánicas del orden *Capparales*, como *Capparaceae*, *Resedaceae*, *Brassicaceae* y *Tropaeolaceae* (Rodman *et al.*, 1996). La mayoría de los GLS se encuentran en las hojas, tallos, ramas, raíces y frutos de las plantas, aunque la

concentración y la composición de estos pueden variar mucho y también pueden cambiar durante el desarrollo de la planta (Verkerk *et al.*, 2009).

Estructuralmente, los GLS son N-hidroxisulfatos de  $\beta$ -tioglucósidos (ésteres de cis-N-hidroximinosulfato) que consisten en dos restos, un glucósido ( $\beta$ -D-tioglucoosa) y un aglucón variable (oxima sulfatada), que se encuentran unidos por un enlace  $\beta$ -tioglucósido (Rosa *et al.*, 1997), como se muestra en la Figura 3. El aglucón es altamente variable debido a la cadena lateral (-R) la cual se origina a partir de aminoácidos tales como: alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), fenilalanina (Phe), metionina (Met), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp) (Fahey *et al.*, 2001; Halkier & Gershenzon, 2006). Es por ello que, se han reportado aproximadamente 132 GLS distintos (Agerbirk & Olsen, 2012).



**Figura 3: Estructura del glucosinolato**

FUENTE: Adaptado de Arora *et al.* (2014)

### 2.3.2. CLASIFICACIÓN Y TIPOS DE GLUCOSINOLATOS

Los GLS se pueden clasificar de diversas maneras como por ejemplo en función de la variabilidad en la estructura de la cadena R, que incluye grupos alifáticos, metiltioalquilo, aromáticos, heterocíclicos, olefinas, hidroxilo o carbonilo. etc. (Fahey *et al.*, 2001). En la Tabla 2 se muestra la clasificación por la clase de GLS como alifático, aromático, alquilo de metiltio, metilsulfinalquilo e indólico. Además, también se clasifican en base a los aminoácidos precursores como los GLS alifáticos derivados de Met, Ile, Leu o Val, los GLS



aromáticos derivados de Phe o Tyr, y los GLS de indol derivados de Trp (Radojčić *et al.*, 2008).

En la mashua los principales GLS que han sido detectados por Ortega *et al.* (2006) fueron los aromáticos: 4-Hidroxibencilo (Glucosinalbina), Bencil (Glucotropaeolina), y m-Metoxibencilo (Glucolimnatina). Por otro lado, en estudios recientes por Ramallo *et al.* (2004), Martín & Higuera (2016) y Campos *et al.* (2019) reportaron que la glucoaubrietina es el GLS más abundante de la mashua, representa el 96-99 por ciento de los GLS totales.

**Tabla 2: Clasificación de algunos glucosinolatos en base a la estructura de la cadena R**

| Clase de GLS          | Nombre sistemático   | Nombre trivial  |
|-----------------------|--|---|
| Alifático             | Alil (2-propenil)<br>3-butenil<br>2 hidroxil-3-butenil (R)<br>4-pentenilo<br>5-metilsulfinilpentil | Singrina<br>Gluconapina<br>Progoitina<br>Glucobrassicinapin<br>Glucoalisina |
| Aromático             | Bencil<br>2-fenetil<br>4-hidroxibencilo<br>4-metoxibencilo   | Glucotropaeolina<br>Gluconasturtiina<br>Glucosinalbina<br>Glucoaubrietina   |
| Alquilo de metiltilio | 3-metiltiopropil<br>4-metiltiobutil  | Glucoiberberina<br>Glucoerucina   |
| Metilsulfinilalquilo  | 3-metilsulfinilpropil<br>4-metilsulfinilbutil  | Glucoiberin<br>Glucoaphanin   |
| Indólico              | Indol-3-ilmetil<br>1-metoxiglucobrassicina   | Glucobrassicina<br>Neoglucobrassicina                                       |

FUENTE : Luang-In *et al* (2014)

En otras plantas y hortalizas se ha reportado otros tipos de GLS como, por ejemplo, 4-metilsulfinilbutilo (Glucorafanina) en brotes de brócoli, brócoli, repollo y rúcula (Osada & Aoyagi, 2014); en la col rizada Korus *et al.* (2014) se reportó 4-hidroxil glucobrassicina, 4-metoxi glucobrassicina y neoglucobrassicina. De acuerdo con Bell *et al.* (2015) en la rúcula se han reportado los GLS más destacados glucosativina (4-mercaptobutil-GLS), glucoerucina (4- (metiltio) butil-GLS) y glucorafanina (4- (metilsulfinil) butil-GLS).

Así mismo, en otros estudios, han demostrado que glucorafasatina es el GLS más abundante en *R. sativus*, que representa aproximadamente 50 a 80 por ciento del contenido total de GLS (Gutiérrez & Pérez, 2004; Hanlon & Barnes, 2011). Por otro lado, en el rábano blanco japonés se ha encontrado Glucoraphasatin (4-metiltio-3-butenil GLS), también conocido como dehidroerucina, glucodehidroerucina, o 4MTB-GLS (Ishida *et al.* 2012). En *Brassica juncea* los principales GLS alifáticos son la Sinigrina (2-propenilo) y Glucobrassicinapin (4-pentenilo) (Sodhi *et al.* 2002).

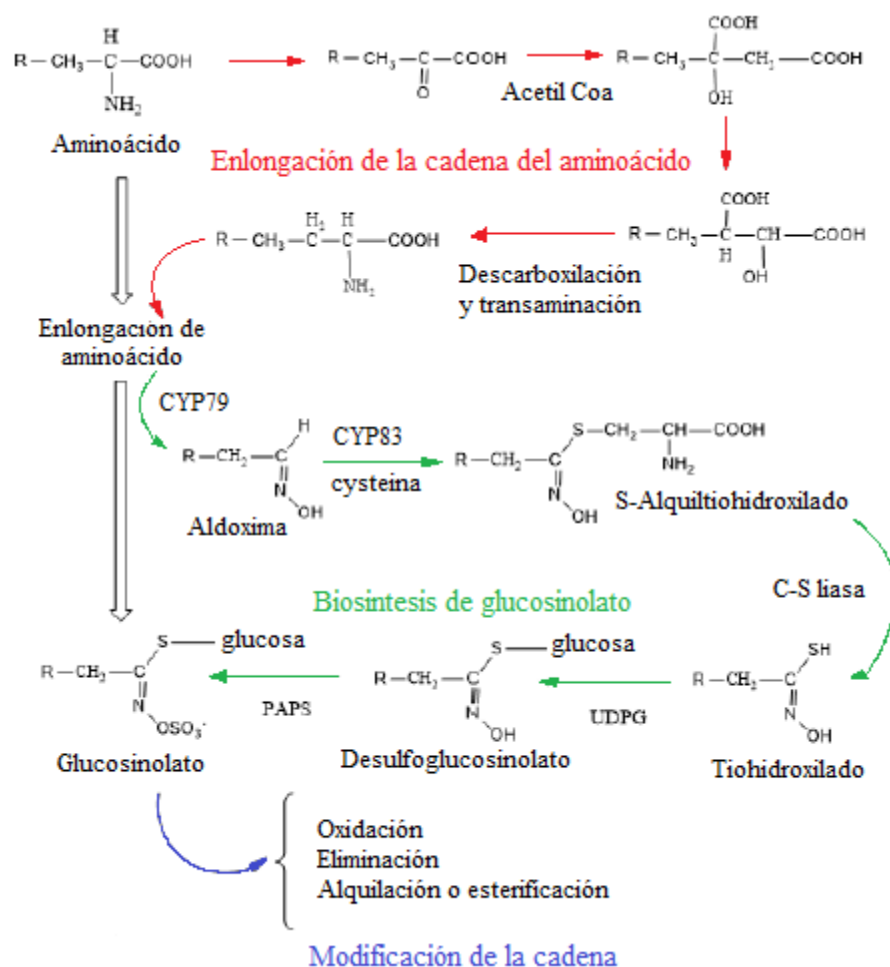
Dentro de los GLS alifáticos predominantes, la sinigrina posee numerosos beneficios terapéuticos como, por ejemplo: anticancerígeno, antifúngico, antioxidante, antiinflamatorio, con respecto a su derivado llamado isotiocianato de alilo se ha evidenciado que presenta actividad antitumoral (Awasthi & Saraswathi 2016; Mazumder *et al.*, 2016). En el caso, de la glucorafanina se ha demostrado que su derivado denominado sulforafano mostró varios efectos anticancerígenos (Li *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2019; Tabart *et al.*, 2018), mientras que en otros GLS como la progoitrina sus derivados mostraron efectos perjudiciales en los animales (Liu *et al.*, 2010).

### **2.3.3. SÍNTESIS DE LOS GLUCOSINOLATOS**

La biosíntesis de GLS procede a través de tres etapas independientes:(i) elongación de la cadena de los aminoácidos precursores seleccionados (solo Met y Phe), (ii) formación de la estructura del GLS central, y (iii) modificaciones secundarias de la cadena lateral del aminoácido (Figura 4) (Sønderby *et al.*, 2010). Junto con el alargamiento de la cadena lateral, las modificaciones secundarias son responsables de las más de 132 estructuras de GLS conocidas (Agerbirk & Olsen, 2012).

## a. ELONGACIÓN DE LA CADENA DE AMINOÁCIDOS PRECURSORES

Primero, el aminoácido se desamina para producir un  $\alpha$ -cetoácido, que luego se extiende por condensación con acetil-CoA. Después de un reordenamiento del grupo hidroxilo, el dicarboxiácido se descarboxila conduciendo a la formación de un  $\alpha$ -cetoácido alargado de cadena. Finalmente, el aminoácido alargado de cadena se produce en una reacción de transaminación (Mikkelsen *et al.*, 2002). Al experimentar ciclos adicionales, se obtiene un mayor alargamiento. Fahey *et al.* (2001) menciona que en las plantas se genera hasta nueve ciclos.



**Figura 4: Esquema de la biosíntesis de los glucosinolatos**

FUENTE: Adaptado de Duarte (2015)

## **b. FORMACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL GLUCOSINOLATO CENTRAL**

Los citocromos P450 que pertenecen a la familia CYP79 son responsables de catalizar la conversión de aminoácidos a aldoximas (Wittstock & Halkier 2002). Estas se oxidan aún más por los citocromos P450 de la familia de genes CYP83 generando una forma oxidada activa de la aldoxina como, por ejemplo, un óxido de nitrilo. Debido a su inestabilidad reacciona con la cisteína, la cual será un donador de azufre para formar S-alquil tiohidroximados (Bak & Feyereisen, 2001; Hansen *et al.*, 2001).

La C-S liasa corta el tiohidroximato de S-alquilo para producir el ácido tiohidroximico (Halkier & Gershenzon, 2006). Dado que los tiohidroximados son compuestos reactivos e inestables reaccionan con la S-glucosiltransferasas de la familia UGT74 (Ishida *et al.*, 2014) y la glucosa se acopla al átomo de azufre. El desulfo GLS resultante se sulfona mediante una sulfotransferasa para formar el GLS final (Grubb & Abel, 2006).

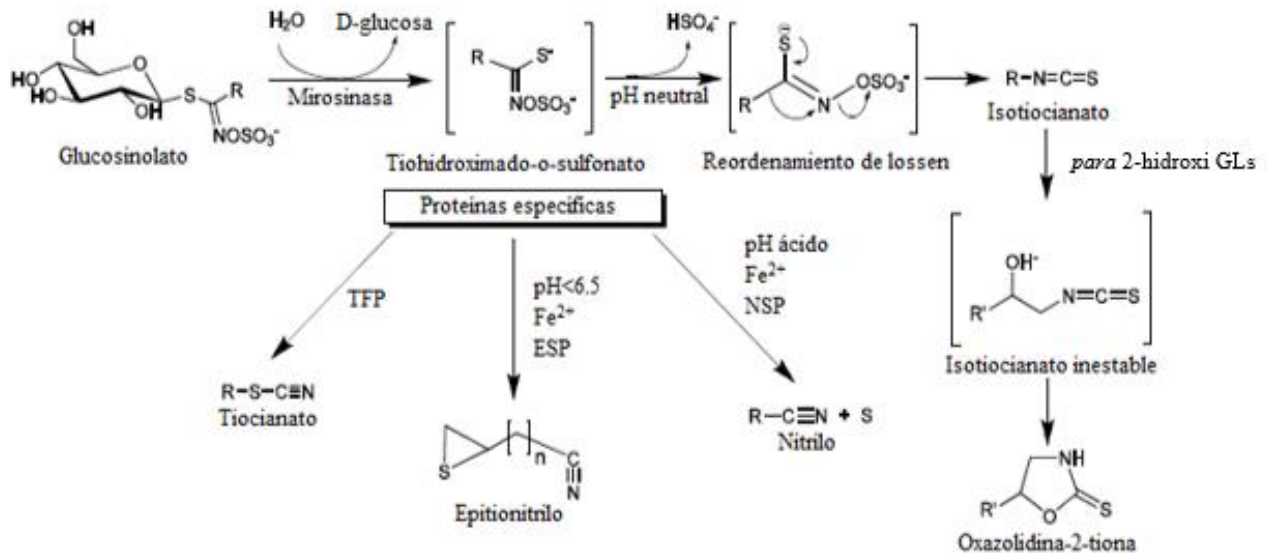
## **c. MODIFICACIONES SECUNDARIAS DE LA CADENA LATERAL DEL AMINOÁCIDO**

El GLS primario formado inicialmente está sujeto a una amplia gama de modificaciones adicionales del grupo R (Halkier & Gershenzon, 2006). Las cadenas laterales se modifican mediante oxidación, hidroxilación, alquenilación, benzoilación y metoxilación (Ishida *et al.*, 2014). Muchas de estas reacciones originan la diversidad estructural de los GLS (Chen *et al.*, 2011). Como por ejemplo la oxigenación del S de los GLS alifáticos, como la glucorafanina, se encuentra en muchas hortalizas de *Brassicaceae* (Ishida *et al.*, 2014).

## **2.4. PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN**

Los productos de transformación de GLS son principalmente producidos por enzimas como la mirosinasa. Esta hidroliza el enlace tioglucosídico del GLS liberando glucosa y tiohidroximado-O-sulfonato. El cual es un intermediario que se puede convertir en una variedad de productos, cuyas estructuras dependen del tipo de GLS, las condiciones de hidrólisis, la presencia de iones y de factores de proteína adicionales (Figura 5) (Finiguerra *et al.*, 2001; Mithen, 2001). Además, estos derivados dependen de las propiedades

bioquímicas de la proteína especificada y la estructura de la cadena lateral de los GLS, pH y presencia de proteínas o cofactores adicionales (Wittstock & Burow 2010; Kissen & Bones 2009). Se ha observado que estos derivados son responsables de las actividades biológicas de los GLS.



**Figura 5: Hidrólisis de glucosinolatos bajo diferentes condiciones**

FUENTE: Adaptado de Luang-In (2013)

### 2.4.1. ISOTIOCIANATOS

Los isotiocianatos (ITC) son productos de derivados de la hidrólisis de los GLS en vegetales crucíferos, una reacción generalmente catalizada por la mirosinasa, una enzima que se activa al ocasionar daño mecánico en el tejido por corte, presión o masticación. Los ITC son productos altamente reactivos del sistema de defensa de mirosinasa- GLS que se encuentran en todo el orden Brassicales (Verkerk *et al.*, 2009).

Los isotiocianatos comúnmente llamados compuestos organosulfurados se producen naturalmente tras la transformación de los GLS de vegetales crucíferos (Molina-Vargas, 2013). Los ITC son básicamente ésteres de ácido isotiocianico ( $\text{H-NCS}$ ) análogo azufrado de los isocianatos ( $\text{R-NCO}$ ). También son isoméricos con tiocianatos ( $\text{R-SCN}$ ) e isoelectrónicos con tiocetonas ( $\text{R}_2\text{C=C=S}$ ) (Satyavan 1989 citado por Kala *et al.*, 2018).

La actividad funcional de los ITC reside en la naturaleza electrofílica del átomo de carbono del grupo  $N = C = S$ , que es capaz de sufrir reacciones de adición con varios nucleófilos (Patai, 2010 y Brown & Hampton, 2011). Puede formar fácilmente conjugados con tioles y unirse covalentemente a la glutatión y proteína celular, incluida la tubulina (Li *et al.*, 2012).

Se han estudiado numerosos ITC, como la iberina (de glucoiberina), feniletil ITC (de gluconasturtina) o prop-2-enyl ITC (de sinigrina) también se ha encontrado que son inductores de enzimas de fase 2 y tener actividad antiproliferativa (Adesida *et al.*, 1996; Canistro *et al.*, 2004; Staack *et al.*, 1998; Stoewsand, 1995). También se encuentra el bencil isotiocianato (BITC) (Sofrata *et al.*, 2011) y el fenil isotiocianato (PITC) (Abreu *et al.*, 2013), aunque de todos ellos, el más estudiado por la potencia de sus efectos es el alil isotiocianato (AITC).

#### **2.4.2. OTROS PRODUCTOS DE LA TRANSFORMACIÓN DE GLUCOSINOLATOS**

La formación de productos que no son de ITC es común en *Brassicaceae*, pero no en otras familias de los *Brassicales* (Kuchernig *et al.*, 2012). Algunos de los productos de hidrólisis alternativos requieren de proteínas especificadoras (ESP) además de la mirosinasa (Burow *et al.*, 2006; Wittstock & Burow, 2010). Hasta la fecha, se han identificado ESP en el brócoli, (*Brassica oleracea ssp. Italica*) (Matusheski *et al.*, 2006), *A. thaliana* (Lambrix *et al.*, 2001) y varias coles y otras *Brassicaceae* (por ejemplo, Kuchernig *et al.*, 2012; Rybarczyk-Plonska *et al.*, 2016; Kołodziejwski *et al.*, 2019).

Las ESPs no tienen actividad hidrolítica en los GLS. Según los perfiles de producto, se denominan proteínas epitioespecificantes (ESP), proteínas especificadoras de nitrilo (NSP) y proteínas formadoras de tiocianato (TFP) (Kuchernig *et al.*, 2012 citado por Wittstock *et al.*, 2016). Otros compuestos como los iones ferrosos y el pH son necesarios para la formación de otros productos como el nitrilo (NIT) (Cole 1976; Matusheski *et al.*, 2001) o azufre para la formación de tiocianato (TC) o epitio nitrilo (ETN) (Kissen *et al.*, 2008; Bones & Rossiter, 2006). Por lo tanto, bajo las condiciones que ocurra la hidrólisis del GLS afectarán las proporciones respectivas de los productos originados (Foo *et al.*, 2000) (Tabla 3).

**Tabla 3: Producto de ITC o NIT esperado de la hidrólisis de GLS catalizada por la mirosinasa vegetal**

| <b>GLS sustrato</b> | <b>ITC producto</b>           | <b>NIT producto</b>             |
|---------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Sinigrina           | Alil isotiocianato            | Alil nitrilo                    |
| Glucotropaeolin     | Isotiocianato de bencilo      | Bencil nitrilo                  |
| Gluconasturtiina    | Fenetil isotiocianato         | Fenetil nitrilo                 |
| Glucoerucina        | Erucina                       | Erucina nitrilo                 |
| Glucoiberina        | Iberina                       | Iberina nitrilo                 |
| Glucorafanina       | Sulforafano                   | Sulforafano nitrilo             |
| Glucosinalbina      | 4-hidroxibencil isotiocianato | 2-(4-hidroxifenil) acetonitrilo |

FUENTE : Luang-In (2013), Radojčić *et al.* (2008) y Blažević *et al.* (2020)

## **2.5. MIROSINASA**

### **2.5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES**

Las mirosinasas son glucohidrolasas de tioglucósido (EC 3.2.1.147) que pueden escindir un GLS para producir una aglucona inestable bajo liberación de glucosa (Blažević *et al.*, 2019). Las mirosinasas clásicas pertenecen a un grupo filogenéticamente distinto dentro de la familia de las glicosil hidrolasas 1 (GH1) y se cree que evolucionaron a partir de los ancestros de  $\beta$ -glucosidasa (Xu *et al.*, 2004).

Esta enzima es un homodímero que contiene tres puentes disulfuro, dos de los cuales son importantes para estabilizar el extremo N de la mirosinasa (Rask *et al.*, 2000). Las mirosinasas generalmente están compuestas por dos polipéptidos de 55-65 kDa idénticos que están muy glicosilados, lo que da como resultado un peso molecular nativo de 120-150

kDa de las proteínas diméricas (Loebers *et al.* 2014, citado por Wittstock *et al.* 2016). Por ejemplo, las mirosinasas solubles en *B. napus* y *S. alba* son proteínas homodiméricas glicosiladas con un peso molecular aparente de 130 a 150 kDa de los cuales los carbohidratos pueden representar hasta el 20 por ciento (Rask *et al.*, 2000).

Se han caracterizado varias isoenzimas de mirosinasa vegetal, diferentes en semillas, plántulas y tejidos vegetativos de *Brassicaceae*. Estas isoenzimas son glucoproteínas con diferentes grados de glicosilación, puntos isoeléctricos variables y parecen ser tanto órganos de plantas como especies específicas (Bones & Iversen, 1985; Thangstad *et al.* 1990). Según James & Rossiter (1991) dos de las isoenzimas de mirosinasa aisladas mostraron diferentes tasas de transformación en diferentes GLS. La especificidad de las enzimas también se ve afectada por otros factores como el epitioespecificador o las proteínas de unión a mirosinasa (Verkerk & Dekker, 2008). Así como, el tipo de planta, el órgano, la etapa de desarrollo, los factores estacionales o las condiciones climáticas son los factores que causan variación en la actividad de la mirosinasa (Verkerk & Dekker, 2008; Andersson *et al.*, 2009).

La mayoría de las mirosinasas vegetales que se han estudiado pertenecen a la familia GH1 de  $\beta$ -*O*-glucosidasas y son activadas por el ascorbato (Burmeister *et al.*, 2000). El ascorbato es un cofactor para la mirosinasa, que promueve el paso limitante de la reacción, es decir, la liberación de la molécula de glucosa desde el sitio activo (Burmeister *et al.*, 2000).

La mirosinasa no solo se encuentra de forma natural en todas las plantas del género *Brassica*, puesto que se ha reportado en insectos especializados (Kissen *et al.*, 2008), como *Brevicoryne brassicae* y *Lipaphis erysimi* (Jones *et al.*, 2002). Las mirosinasas en plantas e insectos se han caracterizado bien, mientras que en algunos microorganismos se sabe poco sobre esta enzima (Bones & Rossiter 1996; Jones *et al.*, 2001 y Jones *et al.*, 2002). A excepción de *Citrobacter* Wye1, donde se ha identificado una secuencia génica completa (Albaser *et al.*, 2016). A diferencia de las mirosinasas de plantas y áfidos, esta enzima pertenece a la familia GH3 de  $\beta$ -*O*-glucosidasas (Jones *et al.*, 2014). Una característica de esta familia es que contiene aspartato como el nucleófilo catalítico en lugar del glutamato que es característico de las mirosinasas de plantas GH1 (Narbad & Rossiter, 2018).



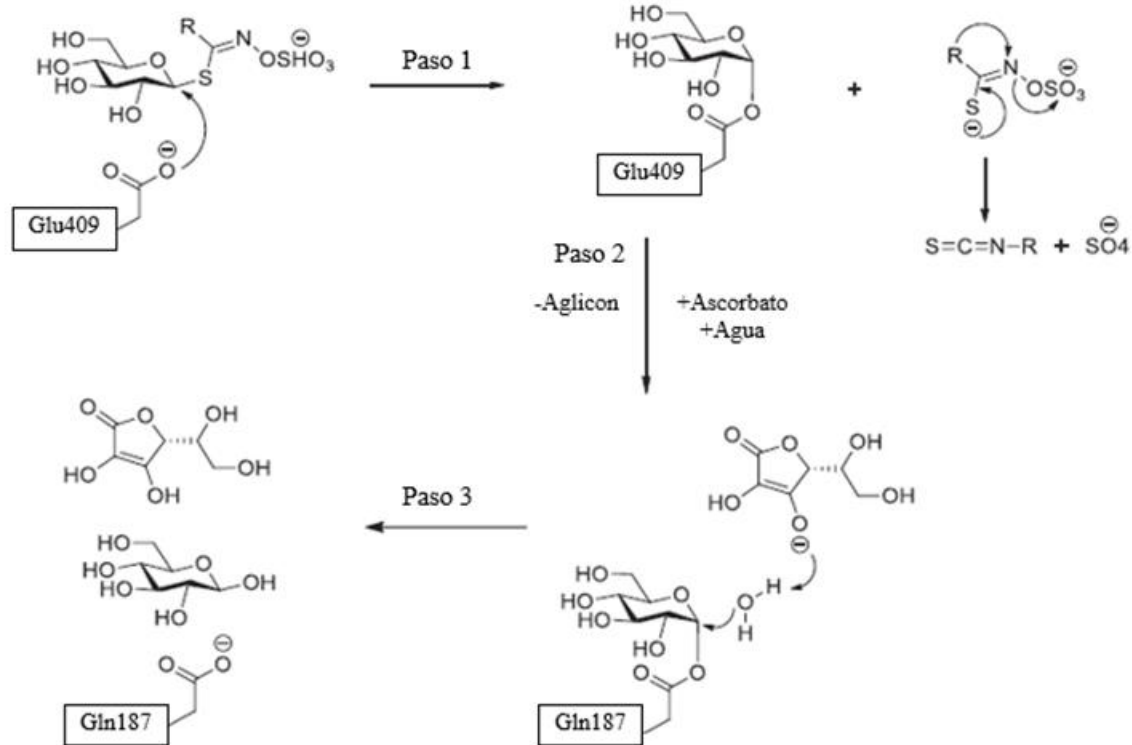
Por otro lado, se ha evidenciado actividad de mirosinasa en hongos y bacterias como por ejemplo en *Aspergillus niger* (Ohtsuru & Hata, 1973), *Enterobacter cloacae* (Tani *et al.*, 1974), *Lactobacillus agilis* R16 (Palop *et al.*, 1995), *Escherichia coli* (Oginsky *et al.*, 1965) y *E. coli* O157: H7 (Luciano & Holley, 2011). Sin embargo, el grado de hidrólisis de los GLS por la mirosinasa bacteriana es mucho menor que por la mirosinasa vegetal (Angelino *et al.* 2015).

## 2.5.2. MECANISMO DE LA MIROSINASA

La mirosinasa es un homodímero estabilizado por algunos iones que existe en coordinación tetraédrica con cuatro residuos His56 y Asp70. Algunos de los residuos de aminoácidos del sitio activo de la enzima están constituido por Arg95, Gln187, Ser190, Asn328, Tyr330 y Glu409 (Xu *et al.*, 2004). Estos compuestos tienen diversas funciones en el mecanismo de la mirosinasa algunos estabilizan el sustrato (GLS) a través enlaces, así como el reconocimiento de la glucosa del GLS.

El mecanismo de reacción catalizada por mirosinasa en presencia de ácido ascórbico consta de tres pasos que menciona Bhat & Vyas (2019) (Figura 6). El primer paso es un ataque nucleofílico por un residuo catalítico GLU409 en el carbono anomérico, donde la mirosinasa retiene la configuración anomérica durante la hidrólisis (Burmeister *et al.*, 1997). El oxígeno glicosídico está protonado por el grupo carboxilo que actúa como ácido general, mientras que el segundo residuo catalítico, un grupo carboxilato (Burmeister *et al.*, 2000). Como resultado de este primer paso de la catálisis, se forma un intermediario glicosil-enzima y se libera la aglucona que sufre una reordenación de tipo Lossen (Bhat & Vyas, 2019).

En un segundo paso, una molécula de agua es activada por el residuo Glu que ahora actúa como un catalizador de base general para hidrolizar el intermediario glicosil-enzima (Henrissat *et al.*, 1995; Morant *et al.*, 2008). Por otro lado, la coenzima el L-ascorbato actúa como una base catalítica exógena. El enlace de ascorbato en el sitio vacío dejado por el aglicón afecta ligeramente el posicionamiento de la molécula de agua que ahora interactúa con el O<sup>3</sup> de ascorbato en lugar de Gln187, generando una desprotonación (parcial) a por ascorbato (Burmeister *et al.*, 2000). Por último, en el tercer paso se da el lanzamiento de la glucosa unida, también se libera la enzima y el por ascorbato (Bhat & Vyas, 2019).



**Figura 6: Mecanismo de reacción catalizada por mirosinasa en presencia de ácido ascórbico**

FUENTE: Adaptado de Bhat & Vyas (2019)

## 2.6. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

### 2.6.1. GENERALIDADES

Las bacterias ácido láctico (BAL) se definen normalmente como un grupo de microorganismos que fermentan principalmente los carbohidratos, produciendo ácido láctico como uno de los principales productos de fermentación (Hugenholtz *et al.* 2002). Estas bacterias lácticas comprenden una amplia gama de géneros e incluye un número considerable de diferentes especies bacterianas pertenecientes al género *Lactobacillus* (Douillard & De Vos, 2014).

Se pueden encontrar en alimentos fermentados, en el medio ambiente, así como en el tracto gastrointestinal humano (GIT) (Gaspar *et al.*, 2013). También se encuentran naturalmente en cavidades humanas y animales, incluida el tracto gastrointestinal (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*), la cavidad oral (*Streptococcus mutans*, *Bifidobacterium longum*), entre otros (Tannock, 1999; Vaughan *et al.*, 2002). Algunas de estas bacterias lácticas tienen la capacidad de sobrevivir a las condiciones gástricas y biliares y adherirse al epitelio intestinal puede conferir una ventaja competitiva y es importante para el mantenimiento bacteriano en el tracto gastrointestinal humano (Naidu *et al.* 1999). Se pueden usar como probióticos para humanos y animales (Chou & Weimer, 1999). En las últimas décadas, ha habido un aumento en el reconocimiento de las LAB en el mantenimiento de la homeostasis dentro del ecosistema del tracto gastrointestinal y en la lucha contra la colonización de patógenos (Ghosh *et al.* 2014).

Algunos lactobacilos desempeñan funciones protectoras al producir compuestos como ácido láctico, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y biosurfactantes, que inhiben el crecimiento de patógenos potenciales (Agboola *et al.*, 2014). Por otro lado, estos microorganismos son capaces de sintetizar otros metabolitos industrialmente interesantes como bacteriocinas, exopolisacáridos (EPS), compuestos aromáticos, edulcorantes, vitaminas, péptidos bioactivos, etc., que a su vez afectan positivamente las propiedades organolépticas, texturizantes, nutricionales y promotoras de la salud del consumidor (Hugenholtz, 2008).

## **2.6.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de organismos Gram-positivos, microaerófilos, no formadores de esporas, inmóviles, catalasa negativa y en forma de cocos y bacilos. A pesar de su metabolismo anaeróbico, son anaerobios aerotolerantes (pueden crecer o actuar en presencia o ausencia de O<sub>2</sub>) y en medios de cultivo sólidos crecen en presencia de aire (Parra, 2010).

La mayoría de las especies pertenecientes a estos géneros tienen alta tolerancia a pH por debajo de 5, lo que les da la ventaja competitiva sobre otras bacterias; la temperatura óptima de crecimiento está en un rango de 20°C a 40°C y varía entre géneros (Hofvendahl & Hahn-

Hägerdal, 2000). Son microorganismos de rápido crecimiento con pequeños genomas, metabolismo simple y relevancia industrial (Frioni, 2006).

Las BAL se caracterizan por metabolizar sustratos como la glucosa, pentosa, entre otros, con el fin de producir energía y por ende producir diferentes productos dependiendo del sustrato y las condiciones del medio en las que se da la reacción. Estos microorganismos se diferencian por el tipo de fermentación de azúcares y se clasifican en homo y hetero fermentación. En homoláctica, la glucólisis (Embden-Meyerhorf-Parnas) solo genera ácido láctico como producto final en condiciones estándar. En heteroláctica, la vía del 6-fosfogluconato / fosfoetolasa genera varios tipos de productos finales. Además de lactato, etanol, acetato y CO<sub>2</sub>. Diferentes condiciones de cultivo pueden alterar significativamente la formación del producto en algunas bacterias ácido lácticas. Estos cambios se atribuyen al metabolismo alterado del piruvato o al uso de aceptores de electrones externos como oxígeno o cualquier compuesto orgánico (Mozzi *et al.*, 2016).

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios del área de Biotecnología Industrial & Bioprocesos del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

#### **3.2. MATERIA PRIMA**

La materia prima que se utilizó para esta investigación, fue el tubérculo de la mashua procedente de Chuñomasas, anexo Quero, distrito de Molinos, provincia de Jauja, región Junín; denominado por el agricultor como *mashua yana ojo*, de pulpa morada.

#### **3.3. BACTERIAS LÁCTICAS**

Las bacterias lácticas empleadas fueron las siguientes:

- *Bifidobacterium bifidum* BIOSTAR®
- *Lactobacillus rhamnosus* GG
- *Lactobacillus casei subsp casei* NRRL B-1922
- *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496
- *Enterococcus faecium* CWBI-B1430
- *Enterococcus mundtii* CWBI-B1431

### **3.4. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS**

#### **3.4.1. MATERIALES**

- Materiales de vidrio: vasos de precipitado, fiolas, matraz erlenmeyer, probetas, tubos de ensayo, todo el material requerido para los diferentes ensayos.
- Micropipetas de 20-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$  y 500-5000  $\mu\text{L}$  (Brand, Alemania)
- Otros: filtros pirinola (Low Protein Binding Hydrophilic LCR, 4 mm diámetro externo, 0.20  $\mu\text{m}$  diámetro de poro, Millipore, Japón), filtros de poliamida (Sartolon polyamid, 0.20  $\mu\text{m}$  diámetro de poro, Sartorius, Alemania), filtros S-pak (Hydrophilic Polyvinylidene Fluoride PVDF, 0.45  $\mu\text{m}$  diámetro de poro, Merck, Alemania), tubos de reacción de 2 mL, tubos falcon de 15 y 50 mL, entre otros.

#### **3.4.2. REACTIVOS**

- Acetato de sodio (Merk, Alemania)
- Acetona (p.a. J.T. Baker, USA)
- Acetonitrilo (grado HPLC. J.T. Baker®, EE.UU.)
- Ácido acético glacial (p.a. J.T. Baker®, EE.UU.)
- Ácido ascórbico (A7506-100G, Sigma, USA)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (OmniPur®, Merck, India)
- Alcohol metílico (p.a. J.T. Baker, USA)
- Alcohol etílico industrial 96% (YOHISA, Perú)
- Cloruro de sodio (Merck, Alemania)
- Diclorometano (LiChrosolv®, Merck, Alemania)
- Enzima sulfatasa (S9626-10KU, Sigma, USA)
- Estándar interno: Sinigrina S1648 (Sigma, USA) y Alil isotiocianato (36682 PESTANAL®, Supelco, Alemania)
- Estándar externo: Bencil isotiocianato (89983, Supelco, Polonia) y 4- metoxibencil isotiocianato (413810050, Acros Organics, Polonia)
- Fosfato de potasio monobásico (Fermont, México)
- Fosfato de sodio dibásico (Merck, Alemania)

- Gel DEAE Sephadex A-25 (GE Healthcare, Suecia)
- Medios de cultivo: Peptona de caseína, extracto de levadura, extracto de carne, peptona de soya (Himedia, India), Agar bacteriológico (Oxoid, UK)
- Metanol (LiChrosolv®, Merck, Alemania)
- Sulfato de sodio anhidro (3891-19, J.T.Baker, México)

### 3.4.3. EQUIPOS

- Agitador magnético con placa calefactora (VELP Scientifica, Modelo F20530162, Italia)
- Agitador orbital y vaiven (GLF, Modelo 1092, Alemania).
- Agitador vortex (Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Modelo VM 2, Alemania)
- Autoclave (Beltec Scientific, Modelo YX-280D, Perú)
- Balanza analítica (Adventurer™ OHAUS, Modelo AR2140, USA).
- Cabina extractora de gases y humos (EXTRACTOR, Modelo CEX-150, Colombia).
- Cabina de seguridad microbiológica tipo a2 (Labconco, Modelo 302310000, USA)
- Cámara climatizada CLIMACELL 404 (MMM, Alemania).
- Centrífuga (Centrifuge 5430R, Eppendorf, Alemania)
- Centrífuga (Hettich Zentrifugen, Modelo MIKRO 220R, Alemania).
- Cocina eléctrica (Magefesa, Modelo MGF811, España).
- Congelador (Electrolux, Modelo H300, Brasil).
- Cromatógrafo líquido de ultra alta presión (UPLC) (Waters, Acquity H-Class, Singapur) acoplado a detector de arreglo de diodos (PDA) (Waters, Acquity, Singapur).
- Cromatógrafo de gases (Trace 1310, Thermo Scientific, China), espectrómetro de masas triple cuadrupolo (TSQ 8000 Evo, Thermo Scientific, CA, Estados Unidos), y automuestreador (TriPlus RSH, Thermo Scientific, Suiza).
- Equipo de baño de ultrasonido (BRANSONIC, Modelo 3510R-DTH, USA).
- Espectrofotómetro (Thermo Spectronic, Genesys 10 UV, USA).
- Espectrofotómetro de microplacas UV/VIS (Biotek, Modelo EONC, U.S.A.).
- Estufa de vacío (VWR, Modelo 1400E-2, USA).
- Liofilizador (Labconco, modelo 117, USA).
- Molino de laboratorio (IKA-werke, Modelo MF 10 Basic, Alemania).

- Potenciómetro (Thermo Orion, Modelo 410, USA)
- Rotavapor (Buchi switzerland, Modelo RII, Suiza)
- Sistema de empaque al vacío (Oster Food Saver, Modelo V2240, México)
- Sistema de purificación de agua (Merck Millipore, Modelo Simplicity UV,
- Ultracongelador vertical (GFL, modelo 6483, Alemania).

### **3.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

#### **3.5.1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y MATERIA SECA**

La humedad se determinó de acuerdo al método gravimétrico porcentual Método 920.151 (AOAC, 1995). Un peso determinado de muestra se secó a 70 °C en estufa a presión de vacío hasta que se obtuvo un peso constante. El contenido de materia seca se calculó por diferencia de pesos y la humedad se calculó por diferencia de este respecto al 100 por ciento.

#### **3.5.2. DETERMINACIÓN DE pH**

El pH de los cultivos se determinó mediante el Método 981.12 (AOAC, 1990). El cultivo se homogenizó y se centrifugó a 3420 g por 10 minutos para obtener el sobrenadante. Finalmente, se determinó el pH en el sobrenadante obtenido.

#### **3.5.3. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ISOTIOCIANATOS Y AMINAS**

La detección y cuantificación se realizó de acuerdo a lo propuesto por Hanschen *et al.* (2017). Del extracto de GLS se extrajo 3 mL, se mezcló con 200 nmol/mL de Allil isotiocianato como estándar interno; y 6 mL de diclorometano en 3 fracciones. Se separó por decantación la fase acuosa; la fase orgánica se secó con sulfato de sodio (0.5 g) y posterior centrifugación. El sobrenadante se evaporó con nitrógeno gaseoso hasta un volumen aproximado de 500 µL. El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases Trace 1310 Gas chromatograph (Thermo Scientific, Rodano, Milan, Italy) acoplado a un triple cuadrupolo TSQ 8000 Evo Mass Spectrometer (Thermo Scientific, USA), usando una columna TR-5MS (0.25 µm, 30 m, 0.25 mm DI) (Thermo Scientific, USA). La temperatura del horno fue



programada como sigue: inicialmente 35 °C (por 3 minutos), luego incrementos a razón de 9 °C/min hasta 90 °C y un periodo isotérmico por 2 minutos, incremento a razón de 3 °C/min hasta 110 °C, incremento a razón de 9 °C/min hasta 210 °C, incremento a razón de 3 °C/min hasta 223 °C, incremento a razón de 9 °C/min hasta 230 °C, incremento a razón de 35 °C/min hasta 310 °C, y un periodo isotérmico por 6 minutos. El volumen de inyección fue de 1 µl en modo splitless. La temperatura del inyector se programó a 190 °C. El Helio, fue usado como gas Carrier, a un flujo de 1mL/min. Para el análisis de espectrometría de masa, la temperatura de la interfase se programó a 310 °C, la temperatura de ionización a 230 °C y la temperatura del cuadrupolo a 150 °C, la velocidad de scan fue 6.614 ciclos scan/s, en un rango de 30-240 m/z. La identificación de compuestos se realizó por comparación de los tiempos de retención y los espectros de masa de estándares previamente inyectados y por comparación con la librería NIST 2.0 library ([www.nist.gov](http://www.nist.gov)). El bencil isotiocianato y 4-metoxibencil isotiocianato fueron cuantificados a partir de curvas de calibración construidas mediante inyección de estándares. Otros compuestos derivados fueron cuantificados con respecto al estándar interno Alil isotiocianato o como derivados de los estándares. Los resultados fueron expresados en nmol/g (bs) de mashua o mL de medio de cultivo.

#### **3.5.4. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSINOLATOS**

Para la determinación del contenido de glucosinolatos (GLS) se siguió la metodología utilizada por Verkerk *et al.* (2001) con algunas modificaciones. Se pesó 0.5 g de harina de mashua en un tubo de 50 mL y se añadió 10 mL de metanol al 70 por ciento a 75 °C. Las muestras se incubaron a 75 °C durante 30 minutos en baño maría. Después se centrifugó a 3420 g por 10 min a 4°C y el sobrenadante se decantó en otro tubo. La extracción se repitió a partir del precipitado siguiendo el mismo procedimiento; los dos sobrenadantes se mezclaron. Dos mililitros del extracto de mashua se añadieron en una columna cromatográfica con DEAE Sephadex A-25 tratada previamente con agua milli-Q. Los GLS se desulfato con 100 µL de sulfatasa, a temperatura ambiente durante 18 horas. Los GLS desulfataron se eluyó con agua milli-Q hasta un volumen final de 4 mL. El eluido se concentró a 60 °C y se almaceno a -20 °C hasta el análisis cromatográfico.

Para el análisis cromatográfico se siguió lo descrito por Campos *et al.* (2019), se utilizó una columna de fase reversa Acquity UPLC BEH C18 (1.7  $\mu$ M, 50 mm, 2.1 mm de DI) con precolumna BEH C18 (1.7  $\mu$ M, 50 mm, 2.1 mm de DI) a 30 °C. La fase móvil estuvo compuesta por Agua (Solvente A) y Acetonitrilo (Solvente B), ambos con 0.1 por ciento de ácido fórmico. Se utilizó un gradiente de elución como sigue: 98 por ciento de A durante dos minutos, luego disminuyó gradualmente a 83 por ciento al minuto 12, 0 por ciento al minuto 13 y mantenido hasta el minuto 16, 98 por ciento al minuto 17 y mantenido hasta el minuto 20, con un flujo de 0.2 mL/min. El volumen de inyección fue de 2  $\mu$ L, y la detección se monitoreo en UV-Vis (229 nm). Los GLS totales fueron identificados por comparación con el espectro de absorción citado en la literatura, se cuantificó mediante una curva de calibración de sinigrina. Los resultados fueron expresados en micromol por g de mashua en base seca ( $\mu$ mol/g bs).

$$\frac{\mu g}{g (bs)} = \frac{(b-\text{área})}{a} \times \frac{V_{te}}{\text{peso (bs)}} \times \frac{V_{sv}}{V_c} \times F_{dil} \times FR$$

Donde: [(b-área) /a]: es la ecuación de sinigrina,  $V_{te}$ : volumen final del extracto,  $V_{sv}$ : volumen después de concentrar en el speed-vac,  $V_c$ : volumen inyectado en la columna;  $F_{dil}$ : factor de dilución,  $FR$ : factor de respuesta de cada GLS (Glucoaubrietina=1, Glucotropaeolina=0.95, Glucosinalbina=0.5, de acuerdo a Wathelet *et al.* (2004)).

### 3.5.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MIROSINASA

Para la determinación de la actividad mirosinasa se siguió la metodología descrita por Li & Kushad (2004) con algunas modificaciones. El método se basa en la determinación de la actividad enzimática de la mirosinasa a través de la evaluación de la velocidad de hidrólisis del estándar sinigrina. La muestra (1 g) se trató con 25 mL de Buffer A (EDTA 1 mM, ácido ascórbico 0.5 mM en buffer fosfato 33.3 mM (pH 6.5) a 4 °C con agitación durante una hora, luego se centrifugó a 3420 g a 4 °C por 20 minutos, se recuperó el sobrenadante. Se dializó 1.5 mL del extracto en membrana de celulosa (cut off de 14 kDa, Sigma, USA) con buffer fosfato de 33.3 mM pH 6.5 (1:100, v/v), a 4 °C por 24 horas. La muestra dializada se diluyó con buffer fosfato 33.3 mM pH 6.5. La reacción se realizó con 810  $\mu$ L de sinigrina 0.12 mM con 90  $\mu$ L de la muestra diluida en buffer fosfato y ácido ascórbico 0.5mM. La reacción se

llevó a cabo en cubetas de cuarzo a una temperatura de 37 °C, longitud de onda de 227 nm y agitación orbital, en el espectrofotómetro de microplacas UV/VIS. La determinación de la actividad de la unidad enzimática se calcula como se describe a continuación:

$$U = \frac{\Delta A}{\Delta T} \times \frac{1}{\text{ext}} \times \frac{V_a}{V_e} \times 1000$$

Dónde:  $\Delta A$ : es la variación de la absorbancia,  $\Delta T$  es la variación del tiempo de reacción en minutos,  $e$ : es el coeficiente de extinción molar ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) de la sinigrina,  $l$ : Longitud de paso de la cubeta (1 cm),  $V_a$ : es el volumen total de la mezcla de ensayo ( $cm^3$ ),  $V_e$  es el volumen de la solución enzimática ( $cm^3$ ). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la escisión de 1  $\mu mol$  de sinigrina por minuto a 37 °C.

### **3.5.6. CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSINOLATOS EN EL CULTIVO BACTERIANO**

Para la determinación del contenido de glucosinolatos (GLS) se siguió la metodología utilizada por Verkerk *et al.* (2001) con algunas modificaciones. Del cultivo bacteriano se extrajo 0.9 mL y se añadió 2.1 mL de metanol puro a 75 °C. Las muestras se incubaron a 75 °C durante 30 minutos en baño maría. Después se centrifugó a 3420 g por 10 min a 4°C y el sobrenadante se decantó en otro tubo. Se extrajo dos mililitros del extracto bacteriano y se añadió en una columna cromatográfica con DEAE Sephadex A-25 tratada previamente con agua milli-Q. Los GLS se desulfataron con 100  $\mu L$  de sulfatasa, a temperatura ambiente durante 18 horas. Después los GLS desulfatados se eluyeron con agua milli-Q hasta un volumen final de 4 mL. El eluido se concentró a 60 °C y se almacenó a -20 °C hasta el análisis cromatográfico.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en una columna de fase reversa Acquity UPLC BEH C18 (1.7  $\mu M$ , 50 mm, 2.1 mm de DI) con precolumna BEH C18 (1.7  $\mu M$ , 50 mm, 2.1 mm de DI) a 30 °C. La fase móvil estuvo compuesta por Agua (Solvente A) y Acetonitrilo (Solvente B), ambos con 0.1 por ciento de ácido fórmico. Se utilizó un gradiente de elución como sigue: 98 por ciento de A durante dos minutos, luego disminuido gradualmente a 83 por ciento al minuto 12 por ciento al minuto 13 y mantenido hasta el minuto 16. 98 por ciento

al minuto 17 y mantenido hasta el minuto 20, con un flujo de 0.2 mL/min. El volumen de inyección fue de 2  $\mu$ L, y la detección se monitoreo en UV-Vis (229 nm). Los GLS totales fueron identificados por comparación con el espectro de absorción citado en la literatura, se cuantificó mediante una curva de calibración de sinigrina. Los resultados fueron expresados en micromol por g de mashua en base seca ( $\mu$ mol).

### **3.5.7. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DERIVADOS DE GLUCOSINOLATO DURANTE LA FERMENTACIÓN CON BACTERIAS LÁCTICAS**

La detección y cuantificación se realizó de acuerdo a lo propuesto por Hanschen & Schreiner (2017). Del medio de cultivo bacteriano se extrajo 1.2 mL y se añadió 2.8 de metanol puro a 75 °C. Las muestras se incubaron a 75 °C durante 30 minutos en baño maría. Después se centrifugo a 3420 g por 10 min y el sobrenadante se decantó en otro tubo. Se extrajo 3 mL, se mezcló con 200 nmol/mL de Allil isotiocianato como estándar interno; y 6 mL de diclorometano en 3 fracciones. Se separó por decantación la fase acuosa; la fase orgánica se secó con sulfato de sodio (0.5 g) y posterior se centrifugó. El sobrenadante se evaporó con nitrógeno gaseoso hasta un volumen aproximado de 500  $\mu$ L. El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases Trace 1310 Gas chromatograph (Thermo Scientific, Rodano, Milan, Italy) acoplado a un triple cuadrupolo TSQ 8000 Evo Mass Spectrometer (Thermo Scientific, USA), usando una columna TR-5MS (0.25  $\mu$ m, 30 m, 0.25 mm DI) (Thermo Scientific, USA). La temperatura del horno fue programada como sigue: inicialmente 35 °C (por 3 minutos), luego incrementos a razón de 9 °C/min hasta 90 °C y un periodo isotérmico por 2 minutos, incremento a razón de 3 °C/min hasta 110 °C, incremento a razón de 9 °C/min hasta 210 °C, incremento a razón de 3 °C/min hasta 223 °C, incremento a razón de 9 °C/min hasta 230 °C, incremento a razón de 35 °C/min hasta 310 °C, y un periodo isotérmico por 6 minutos. El volumen de inyección fue de 1  $\mu$ l en modo splitless. La temperatura del inyector se programó a 190 °C. El Helio, fue usado como gas Carrier, a un flujo de 1mL/min. Para el análisis de espectrometría de masa, la temperatura de la interfase se programó a 310 °C, la temperatura de ionización a 230 °C y la temperatura del cuadrupolo a 150 °C, la velocidad de scan fue 6.614 ciclos scan/s, en un rango de 30-240 m/z. La identificación de compuestos se realizó por comparación de los tiempos de retención y los espectros de masa de estándares previamente inyectados y por comparación con la librería NIST 2.0 library. El bencil

isotiocianato y 4-metoxibencil isotiocianato fueron cuantificados a partir de curvas de calibración construidas mediante inyección de estándares. Otros compuestos derivados fueron cuantificados con respecto al estándar interno Alil isotiocianato o como derivados de los estándares. Los resultados fueron expresados en nmol/mL de medio de cultivo.

### **3.5.8. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS**

#### **a. RECUENTO EN PLACA**

La metodología empleada fue la descrita por Sánchez *et al* (2017), donde se añadió una alícuota del pre cultivo al medio de cultivo que sea requirió para la bacteria láctica. Del medio de cultivo se extrajo 1 mL para realizar las diluciones decimales empleando tubos con 9 ml de suero fisiológico. Después se añadió 100 µL de cada dilución en las placas Petri y se adicionó 15 mL de agar MRS o MRS con cisteína. Se homogenizó y se incubó las placas Petri en posición invertida a 37 °C durante 24 horas. Para finalizar se realizó el conteo de placas que tenga entre 30 a 300 colonias.

#### **b. BIOMASA**

Se determinó midiendo la densidad óptica (DO) usando una curva estándar frente al peso de las células secas. La DO se midió a 600 nm en un espectrofotómetro.

### **3.6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

#### **3.6.1. OBTENCIÓN DE HARINA DE MASHUA**

Las mashuas cosechadas provenientes de la provincia de Junín, se trasladaron inmediatamente a las instalaciones del laboratorio en Lima. Se siguió el procedimiento descrito por Córdova (2012) con algunas modificaciones:

- **Selección.** La mashua cosechada se seleccionó, eliminando los tubérculos que se encuentren en mal estado.

- **Limpieza.** Los tubérculos seleccionados se limpiaron, ayudándose de un cepillo/brocha, con el fin de retirar tierra y partículas extrañas, adheridas.
- **Aplicación de estrés abiótico post-cosecha.** Se realizó el almacenamiento en condiciones controladas de 12 °C y 80 %HR. Durante este tratamiento, se retiró de manera interdiaria y al azar 0.5 kg aproximadamente de mashua. Esta operación se realizó con el fin de determinar el día en el cual se produce mayor contenido de GLS y maximizar el contenido de estos GLS, las muestras que fueron retiradas siguieron las etapas posteriores, las otras continuaron con el almacenamiento.
- **Lavado y desinfección.** Las mashuas que finalizo el tiempo bajo estrés abiótico se lavaron manualmente con agua potable, con el fin de eliminar partículas adheridas que en la etapa de limpieza no se pudieron retirar. Posteriormente, se desinfectó con una solución de 200 ppm de cloro libre residual. A continuación, se oreó y se secó con papel adsorbente.
- **Liofilizado.** Las muestras se liofilizaron a -45 °C (condensador) y  $120 \times 10^{-3}$  mBar de presión.
- **Molienda y tamizado.** Las muestras liofilizadas se molieron con un molino de laboratorio, con el objetivo de reducir el tamaño de las partículas; y, posteriormente, se tamizó para homogenizar el tamaño de la muestra.
- **Embolsado.** Las muestras de mashua liofilizadas molidas y tamizadas se colocaron en bolsas de polietileno de alta densidad con cierre hermético.
- **Almacenamiento.** Las muestras se almacenaron a -80°C, hasta el momento del análisis respectivo.

Finalizada la obtención de la harina de mashua se realizó los análisis respectivos cuantificó los GLS, la actividad mirosinasa y el contenido de humedad de las muestras de mashua sometidas a estrés abiótico durante doce días, con el fin de obtener mayor cantidad de GLS para las siguientes etapas del estudio.

### **3.6.2. ACONDICIONAMIENTO Y CULTIVO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS**

#### **a. REACTIVACIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS**

Las bacterias lácticas liofilizadas de *Lactobacillus* y *Enterococcus* se reactivaron en el caldo MRS. En el caso de las *Bifidobacterium bifidum* se reactivaron en caldo MRS con 0.5 g/L de cisteína. HCl. La incubación se realizó a 37°C durante 24 horas.

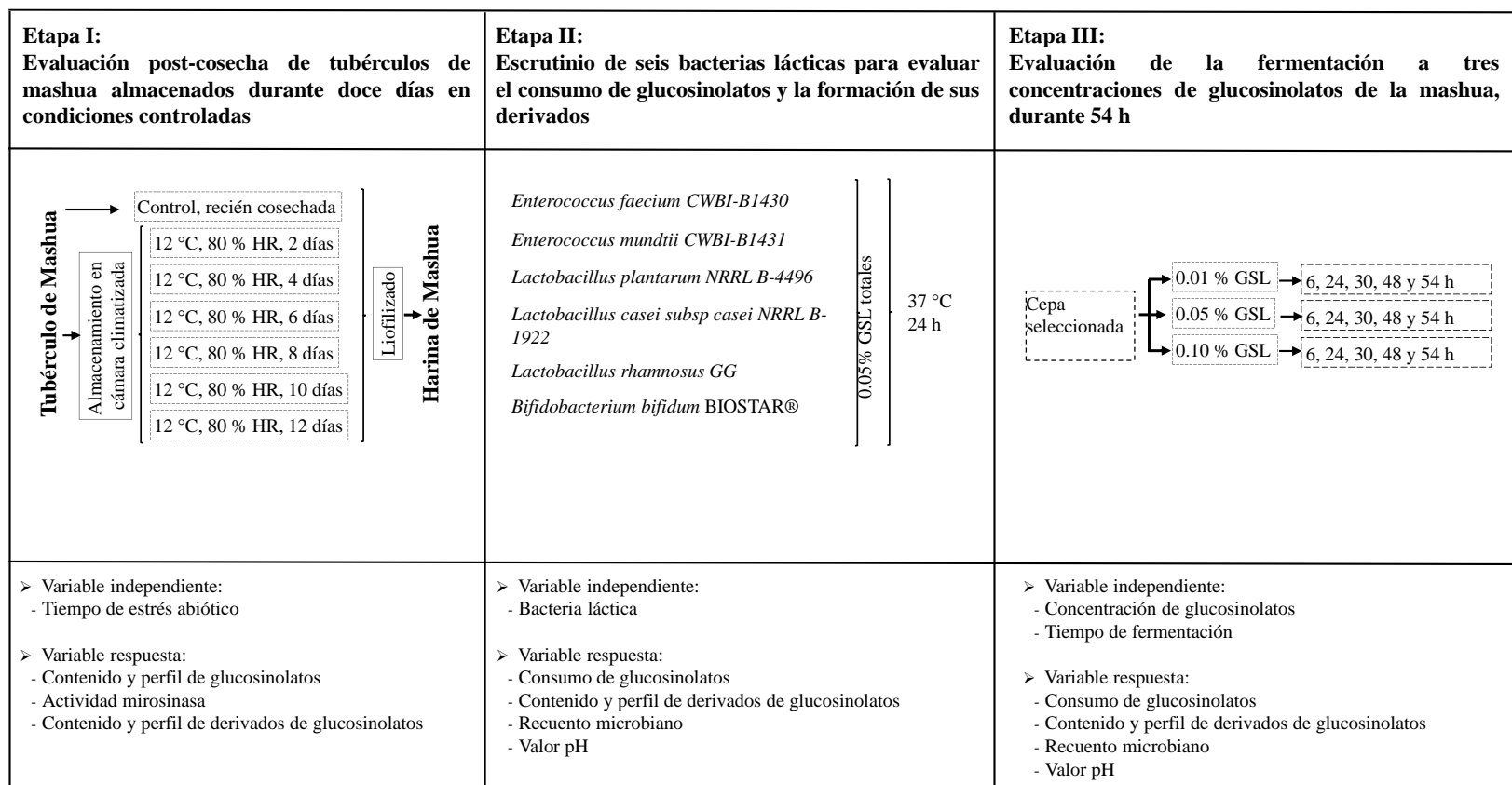
#### **b. PREPARACIÓN DEL PRE CULTIVO Y CULTIVO**

Para el pre cultivo se inoculó las bacterias lácticas reactivadas de *Lactobacillus* y *Enterococcus* en caldo MRS, a excepción de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium bifidum* que se inocularon en caldo MRS con 0.5 g/L de cisteína-HCl. La incubación de los precultivos de algunas *Lactobacillus* y *Enterococcus* a 37 °C por 16 horas exceptuando a *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei sup casei* NRRL B-1922 y *Bifidobacterium bifidum* BIOSTAR® que fue a 37 °C por 20 horas con agitación constante. Para la preparación del cultivo se procedió a adicionar 200 µL del precultivo (10<sup>7</sup> UFC/mL) a un medio que contenía 5 mL del extracto de GLS de mashua a una concentración de 0.05 por ciento y 200 µL de ácido ascórbico previamente pasados por membrana de 0.45 µm de diámetro de poro. Para los *Lactobacillus* y *Enterococcus* se llevaron a cabo en erlenmeyer de 125 mL que contenían 15 mL de medio de cultivo. A diferencia de las *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium bifidum* que se llevó a cabo en frascos de 24 mL conteniendo 15 mL de medio de cultivo y los componentes indicados.

### **3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL**

El estudio consideró tres etapas (Figura 7), post-cosecha de mashua, escrutinio de potenciales bacterias lácticas que utilizan GLS y evaluación de la fermentación con la bacteria láctica que consuma mayor porcentaje de los GLS.

Para la primera etapa la variable independiente fue el tiempo de estrés abiótico al cual fueron sometidos los tubérculos de mashua, se tomó muestras cada dos días durante 12 días, las



**Figura 7: Diseño experimental para el estudio de la fermentación de glucosinolatos de mashua (*Tropaeolum tuberosum*) con bacterias lácticas**



variables respuestas fueron el contenido y perfil de GLS, el contenido y perfil de los derivados de GLS y actividad mirosinasa.

La segunda etapa fue el escrutinio de seis bacterias lácticas para determinar cual (es) son capaces de degradar los GLS de la mashua. Donde la variable independiente fue la bacteria láctica en estudio y las variables respuesta fueron, el consumo de GLS, el contenido y perfil de los derivados de GLS, el recuento microbiano y el valor final de pH. Se seleccionó la bacteria láctica en cuyo medio de cultivo se encontró la menor cantidad de GLS.

Para la realización de la tercera etapa, la bacteria láctica seleccionada de la etapa anterior fue sometida a crecimiento en un medio de cultivo conteniendo GLS de mashua (0.01, 0.05 y 0.1 por ciento) por diferentes tiempos (6, 24, 30, 48 y 54 horas). Donde las variables respuesta fueron el consumo de GLS, el contenido y perfil de los derivados de GLS, el recuento microbiano y el valor de pH.

### **3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En la primera etapa se utilizó un Diseño completamente al azar, donde la variable independiente fue el tiempo de estrés abiótico (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días de almacenamiento) y las variables respuestas fueron el contenido y perfil de GLS totales, el contenido y perfil de los derivados de GLS y actividad mirosinasa. En la segunda etapa, también se utilizó un DCA, donde la variable independiente fueron las bacterias lácticas, mientras que la variable respuesta fueron el consumo de GLS, el contenido y perfil de los derivados de GLS, el recuento microbiano y el valor final de pH. En la tercera etapa, se usó un Diseño de bloques completamente al azar (DBCA) considerando a la concentración de glucosinolatos como variable independiente, como factor de bloque a las horas y como variables respuesta el consumo de GLS, el contenido y perfil de los derivados de GLS, el recuento microbiano y el valor de pH.

Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se evaluaron mediante un Análisis de varianza (ANVA) unidireccional con una significancia del 5 por ciento y se utilizó el *software* estadístico Statgraphics Centurion XVI.I y se comparó mediante la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS ABIÓTICO POST-COSECHA DE MASHUA A CONDICIONES CONTROLADAS**

#### **4.1.1. EFECTO DEL ESTRÉS ABIÓTICO POST-COSECHA SOBRE LOS GLUCOSINOLATOS**

En la Tabla 4, se presenta el contenido de humedad y glucosinolatos (GLS) de la mashua almacenada a condiciones controladas en cámara climatizada, 12 °C y 80 %HR durante 12 días (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12). Respecto al contenido de humedad (Anexo 1) se obtuvo inicialmente 93.76 por ciento, el cual se mantuvo hasta el día 12 que terminó con un 89.06 por ciento. Estos valores se encuentran dentro del rango mencionado por Grau *et al.* (2003) y King & Gershoff (1987). La diferencia en el contenido de humedad se podría deber al estado de madurez al momento de la cosecha y a las condiciones de almacenamiento (Alia-Tejacal *et al.*, 2007).

Por otro lado, se observó un comportamiento oscilante con tendencia a aumentar hasta el décimo día respecto al contenido total de GLS totales. Este comportamiento reportado es similar a los determinados por Campos *et al.* (2019) y Medina (2020) en mashua. En este sentido, estaría influenciado por los cambios en las condiciones post-cosecha, en un primer momento, la adaptación de los tubérculos a las condiciones controladas de almacenamiento (temperatura y humedad relativa) podrían haber originado la disminución en el contenido de GLS, los cuales posteriormente se incrementan como un mecanismo de defensa a las condiciones de almacenamiento.

**Tabla 4: Contenido de glucosinolatos en mashua almacenados en condiciones controladas durante 12 días**

| Días | Humedad (%)                   | Contenido ( $\mu\text{mol/g bs}$ ) |                               |                               |                                |
|------|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
|      |                               | Glucosinalbina                     | Glucotropaeolina              | Glucoaubrietina               | GLS Total                      |
| 0    | 93.76 $\pm$ 1.93 <sup>a</sup> | 0.34 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>       | 6.87 $\pm$ 0.68 <sup>b</sup>  | 41.38 $\pm$ 1.23 <sup>c</sup> | 48.59 $\pm$ 1.77 <sup>b</sup>  |
| 2    | 93.74 $\pm$ 2.39 <sup>a</sup> | 0.46 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>       | 7.38 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>  | 29.79 $\pm$ 2.16 <sup>b</sup> | 37.63 $\pm$ 2.41 <sup>c</sup>  |
| 4    | 94.35 $\pm$ 1.93 <sup>a</sup> | 0.43 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>       | 8.98 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>  | 40.89 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup> | 50.3 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>   |
| 6    | 94.59 $\pm$ 1.97 <sup>a</sup> | 0.24 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>       | 8.01 $\pm$ 0.48 <sup>ab</sup> | 25.84 $\pm$ 0.96 <sup>d</sup> | 34.1 $\pm$ 1.25 <sup>c</sup>   |
| 8    | 93.22 $\pm$ 2.31 <sup>a</sup> | 0.58 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>       | 6.68 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>  | 44.47 $\pm$ 1.44 <sup>a</sup> | 51.73 $\pm$ 2.03 <sup>ab</sup> |
| 10   | 93.15 $\pm$ 2.19 <sup>a</sup> | 0.45 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>       | 6.7 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>   | 48.38 $\pm$ 1.16 <sup>b</sup> | 55.53 $\pm$ 1.30 <sup>a</sup>  |
| 12   | 89.06 $\pm$ 1.28 <sup>a</sup> | 0.11 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>       | 7.33 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>  | 19.43 $\pm$ 1.13 <sup>c</sup> | 26.88 $\pm$ 1.44 <sup>d</sup>  |

Promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ )

Con respecto, a los tipos de GLS aromáticos encontrados en la mashua se reportó glucosinalbina glucotropaeolina y glucoaubrietina (Anexo 2), siendo este último compuesto el que destacó, con un rango de 87.12 – 72.29 por ciento (55.53 -26.88  $\mu\text{mol/g, bs}$ ) de los GLS totales. Dichos valores son superiores a los reportados en otras plantas, como, por ejemplo: *Bunias orientalis*, *Tropaeolum majus* (3.19 y 0.34 por ciento, respectivamente, Badenes-Pérez *et al.*, 2019) y *Pentadiplandra brazzeana Baillon* (81 por ciento; De Nicola *et al.*, 2012), mientras que fue inferior (97.43 por ciento) al determinado en mashua (Limaymanta, 2018).

Por otro lado, se observaron que existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ , Anexo 3-6) en el contenido de GLS totales, glucotropaeolina, glucoaubrietina y glucosinalbina. Otros

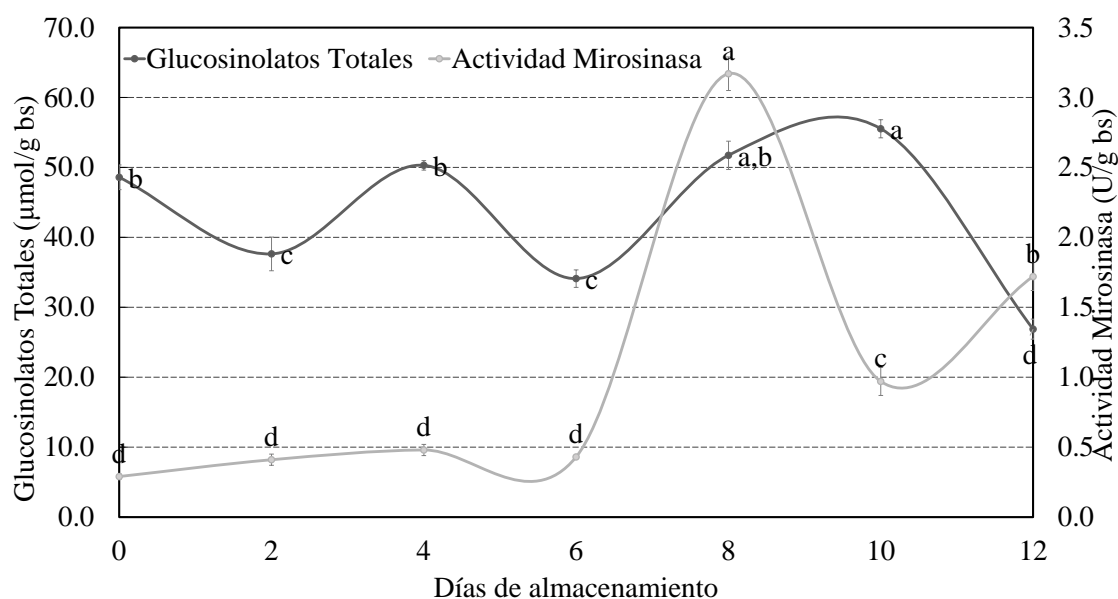
autores, Ku *et al.* (2013) y Kissen *et al.* (2016) reportaron incremento en el contenido de GLS en el brócoli y *Arabidopsis thaliana* al almacenar en frío (15-9 °C). Además, Baenas *et al.* (2020) y Barba *et al.* (2016) indicaron que a bajas temperaturas (4-5 °C) se observó una menor disminución en el contenido de GLS totales en rábano y no se presentó variaciones en brócoli. Lo señalado sugiere que, el estrés inducido por las bajas temperaturas podría causar un cambio en el metabolismo, generando un aumento el contenido de GLS en ciertas plantas.

Con respecto al contenido de GLS totales de mashua, tal como se observa en la Tabla 4, estos valores coinciden con los resultados reportados por Campos *et al.* (2019) (4.9-54.2  $\mu\text{mol/g}$ , bs) y Ortega *et al.* (2006) (0.27-50.74  $\mu\text{mol/g}$ , bs) y distan de los reportados por Martín & Higuera (2016) (0.3-25.8  $\mu\text{mol/g}$ , bs), y Ramallo *et al.* (2004) (36.5-90  $\mu\text{mol/g}$ , bs). Esta diferencia de cantidades estaría influenciada por la variedad, la región y los estados de crecimiento de los tubérculos (Martín & Higuera, 2016). Cabe resaltar que los tubérculos que se emplearon para el estudio fueron domésticos o asilvestrados por lo que presentaron mayor contenido de GLS en comparación de otros autores; probablemente por la adaptación del tubérculo a las condiciones climáticas tal como lo señala Ortega *et al.* (2006).

Por otro lado, el contenido de GLS totales reportados en mashua es mayor en comparación con otros vegetales y plantas que presentan diferentes tipos de GLS (alifáticos, aromáticos, indólicos), en  $\mu\text{mol/g}$  (bs), 17.9 en mostaza india (Nugrahedhi *et al.*, 2014), 21.44, 14.70 y 17.26 para la col blanca, col roja y brócoli; respectivamente (Verkerk *et al.*, 2001), 31.4–36.2 para maca (Yábar *et al.*, 2011); 10.9 en pak choi (Yang *et al.*, 2010), tara y árbol de jade, 6.55 y 45.56  $\mu\text{mol/g}$ , respectivamente (Najjaa *et al.*, 2017); *Bunias orientalis*, *Moringa oleifera* y *Tropaeolum majus*, 33.3-36.2, 28-39.5 y 28-40.4  $\mu\text{mol/g}$ , respectivamente (Badenes-Perez, 2019), *Pentadiplandra brazzeana* Baill, 48  $\mu\text{mol/g}$  (Nicola *et al.*, 2012). En síntesis, este análisis presentó no solo un mayor contenido de GLS aromáticos, los cuales tienen alta bioactividad y aplicaciones potenciales en bioquímica, genética y química medicinal (Quan *et al.*, 2013), en comparación a otros autores, sino también, en comparación con otros vegetales y plantas.

#### 4.1.2. EFECTO DEL ESTRÉS ABÍOTICO POST-COSECHA SOBRE LA ACTIVIDAD MIROSINASA Y GLUCOSINOLATOS TOTALES

En la Figura 8 se observa el contenido de GLS totales y la actividad mirosinasa durante el tratamiento de estrés post-cosecha, observándose que no existe una correlación entre esas dos variables. Resultados similares fueron reportados por Bones (1990) y Li & Kushad (2004) que no encontraron correlación directa entre esas variables en hojas, raíces, tallos o semillas en varias líneas de *Brassica napus*. En relación a la actividad mirosinasa se observó un incremento significativo el día 8 (Anexo 7). Del mismo modo, Andréasson *et al.* (2001) y Bones (1990) reportaron alta actividad de mirosinasa en la parte superior de las raíces de colza madura. Al respecto Andréasson *et al.* (2001) indican que este incremento se debe a que, durante la germinación de la planta, las proteínas que se unen a la mirosinasa desaparecen de las células de idioblásticas y en paralelo se da la disminución de GLS. Por lo tanto, la actividad de la mirosinasa aumentaría al reducir las proteínas de unión de mirosinasa y los GLS de la mashua.



**Figura 8: Contenido de glucosinatos ( $\mu\text{mol/g bs}$ ) y actividad mirosinasa ( $\text{U/g bs}$ ) de las muestras de mashua almacenadas durante 12 días en refrigeración**

Promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes en la misma curva indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ )

En la Figura 8, también se puede observar que el día 10 disminuye la actividad mirosinasa e incrementa los GLS. Según Lee *et al.* (2017), Lim *et al.* (2015), Verkerk *et al.* (2001) y Song & Thornalley (2007) reportaron una disminución de la actividad mirosinasa en raíces de rábano y verduras de Brassica, asociándolo con la senescencia post-cosecha de las raíces de rábano (Lee *et al.*, 2017), o el almacenamiento en frío por la hidrólisis de GLS (Verkerk *et al.*, 2001; Song & Thornalley, 2007). Así mismo, Lee *et al.* (2017) mencionan que la disminución de la actividad mirosinasa podría haber sido resultado de la disminución de la concentración de ácido ascórbico. Considerando que la enzima mirosinasa es fuertemente activada por el ácido ascórbico, debido a que esta molécula es un cofactor que sirve como catalizador en la hidrólisis de GLS (Burmeister *et al.*, 2000) y puede influir en gran medida en eficacia del sistema de defensa GLS-mirosinasas de la planta (Bhat & Vyas, 2019). Si bien en este estudio no se evaluó el contenido de ácido ascórbico, Ramón (2017) reportó una disminución de ácido ascórbico en mashua que fue sometida a estrés abiótico (9-15°C) durante 15 días. Por lo que, probablemente podría ser un factor importante que influyó en el incremento y disminución de la actividad mirosinasa.

Con respecto a la cantidad de actividad mirosinasa, como se observa en la Figura 8 la mayor actividad enzimática se presenta el día 8, 3.17 U/g bs. Este valor reportado, fue superior al determinado en U/g bs, 1.286 en col (Banerjee *et al.*, 2014), 1.81 en brotes de rábano (Li *et al.*, 2016), 2.79 y 1.61 en colza, Kohlrabi y col blanca, respectivamente (Piekarska *et al.*, 2014) y 0.043 en hojas de mostaza india fermentadas (Nugrahedi *et al.*, 2014) y similar al reportado en col de Savoy 3.04 (Kołodziejewski *et al.*, 2019) y menor del reportado en mashua refrigerada por 9 días, 5.1 (Campos *et al.*, 2019). En general, como se observa en la Figura 8, los valores que se obtuvieron de actividad mirosinasa se encuentran en un rango de 0.29 a 3.17 U/g bs; a diferencia de Campos *et al.* (2019) quienes reportaron valores de un rango de 1.9 a 6.8 U/g bs de mashua, cuando fueron sometidas a estrés abiótico de refrigeración, sombra y soleadas. Según, Pocock *et al.* (1987) citados por Olukayode *et al.* (2015) mencionan que las variaciones en la actividad mirosinasa podría atribuirse a factores genéticos y/o factores ambientales (condiciones agronómicas y climáticas). Del mismo modo, Larkin & Griffin (2007) indican que la temporada de cosecha también influye en la actividad de la mirosinasa. Por otro lado, esta diferencia de resultados también se podría deber a que las mediciones de la actividad de mirosinasa en muestras de plantas pueden verse alteradas por el efecto amortiguador de las proteínas presentes en el material vegetal

(Piekarska *et al.*, 2014), pero considerando que es una respuesta a las condiciones de estrés abiótico, justificaría las diferencias.

#### **4.1.3. EFECTO DEL ESTRÉS ABIÓTICO POST-COSECHA SOBRE LOS PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN DE LOS GLUCOSINOLATOS**

La mashua ha sido señalada como una fuente de compuestos bioactivos entre ellos los GLS; por la acción de la enzima mirosinasa en los GLS se obtienen diferentes derivados tales como los isotiocianatos (ITC), nitrilos (NIT), entre otros, los cuales son considerados importantes por ejercer una multitud de efectos beneficiosos para la salud, como por ejemplo los efectos antimicrobianos, antiinflamatorios, antitrombóticos y quimiopreventivos (Ku & Bae, 2014; Veeranki *et al.*, 2015).

La Tabla 5 (Anexos 8-12), muestra los derivados de GLS de la mashua sometida a estrés abiótico a condiciones controladas de almacenamiento (12 °C y 80 %HR) durante doce días. Los compuestos que se identificaron fueron 4-metoxibencil isotiocianato, 4-metoxibenceno acetonitrilo, (4-metoxibencilalcohol) metil éter, bencil isotiocianato y benceno acetaldehído (Anexo 13).

Dentro de los derivados de los GLS, se encuentra en mayor cantidad el 4-metoxibencil isotiocianato, derivado de la transformación de la glucoaubrietina (Chhajed *et al.*, 2020). El 4-metoxibencil isotiocianato presentó concentraciones variables durante el almacenamiento post-cosecha a condiciones controladas de almacenamiento (12 °C y 80 %HR). Se observó la máxima y mínima concentración, 3.64 y 0.63  $\mu\text{mol/g}$  (bs) en los días 4 y 12, respectivamente; la disminución de ese compuesto podría ser porque los ITC generalmente disminuyen en la etapa de madurez excesiva (Hanschen *et al.*, 2017) después de la cual vendría la senescencia, en nuestro caso a los 12 días post-cosecha. Valores superiores a los obtenidos en la presente investigación han sido reportados para Laifuzi (20.3  $\mu\text{mol/g}$ ) y en semillas de col rizada china (12.6  $\mu\text{mol/g}$ ) (Choi *et al.*, 2004). Otros autores han reportado valores menores para sus isotiocinatos predominantes; sulforafano en raíces de rábano (0.0847  $\mu\text{mol/g}$ , bs) después de 10 semanas de crecimiento y en hojas de rábano (0.0115 a 0.0352  $\mu\text{mol/g}$ , bs) durante el periodo de crecimiento (Lim *et al.*, 2015); así mismo, en el brócoli el sulforafano, con 0.214  $\mu\text{mol/g}$ , bs (Hanschen *et al.*, 2017); coliflor cruda, 0.015

$\mu\text{mol/g}$  y en hojas de mostaza cruda,  $0.613 \mu\text{mol/g}$  (Tang *et al.*, 2013); y en *Brassica alba* L. Boiss,  $0.34 \mu\text{mol/g}$  (Choi *et al.*, 2004).

**Tabla 5: Productos de la transformación de glucosinolatos de la mashua almacenados durante 12 días en refrigeración**

| Días | Contenido ( $\mu\text{mol/ g bs}$ ) |                              |                                     |                      |                        |
|------|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|----------------------|------------------------|
|      | 4-Metoxibencil isotiocianato        | 4-Metoxibenceno acetónitrilo | (4-Metoxibencil alcohol) metil éter | Bencil isotiocianato | Benceno acetaldehído   |
| 0    | $2.892 \pm 0.092^c$                 | $0.075 \pm 0.002^a$          | $0.221 \pm 0.021^{ab}$              | $0.014 \pm 0.000^e$  | $0.011 \pm 0.000^{ab}$ |
| 2    | $1.670 \pm 0.165^d$                 | $0.083 \pm 0.004^a$          | $0.195 \pm 0.001^{bc}$              | $0.020 \pm 0.001^d$  | $0.008 \pm 0.001^c$    |
| 4    | $3.639 \pm 0.272^a$                 | $0.062 \pm 0.006^b$          | $0.151 \pm 0.011^d$                 | $0.032 \pm 0.002^b$  | $0.009 \pm 0.001^{bc}$ |
| 6    | $3.221 \pm 0.187^{bc}$              | $0.056 \pm 0.003^{bc}$       | $0.171 \pm 0.011^{cd}$              | $0.020 \pm 0.002^d$  | $0.013 \pm 0.001^a$    |
| 8    | $1.634 \pm 0.103^d$                 | $0.054 \pm 0.004^{bc}$       | $0.173 \pm 0.005^{cd}$              | $0.044 \pm 0.003^a$  | $0.005 \pm 0.000^d$    |
| 10   | $3.339 \pm 0.007^{ab}$              | $0.055 \pm 0.003^{bc}$       | $0.231 \pm 0.008^a$                 | $0.025 \pm 0.002^c$  | $0.005 \pm 0.000^d$    |
| 12   | $0.632 \pm 0.019^e$                 | $0.049 \pm 0.002^c$          | $0.221 \pm 0.007^{ab}$              | $0.013 \pm 0.001^e$  | $0.013 \pm 0.001^a$    |

Promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ )

Respecto a otros compuestos derivados de la glucoaubrietina de mashua, tenemos el (4-metoxibencilalcohol) metil éter ( $0.231 - 0.151 \mu\text{mol/g bs}$ ) y 4-metoxibenceno acetónitrilo ( $0.083 - 0.049 \mu\text{mol/g bs}$ ). Es posible que estos derivados sean el resultado de la transformación del 4 metoxibencil isotiocianato originado a partir de la glucoaubrietina, por eliminación reductiva y acción de una sulfatasa.

Los resultados de la Tabla 5, muestran la presencia de bencil isotiocianato, con valores comprendidos entre  $0.044$  a  $0.013 \mu\text{mol/g (bs)}$ ; el cual es producido a partir de la glucotropaeolina (Esparza *et al.*, 2015; Chhajed *et al.*, 2020). El bencil isotiocianato es un compuesto que tiene propiedades antioxidantes y anticancerígenas; muestra un efecto



inhibitorio sobre la migración e invasión celular (Lai *et al.*, 2010 citado por Santhi & Shanthipriya, 2014); y es uno de los compuestos más activos que inhibe hongos patógenos de plantas (Manici *et al.*, 1997). También se ha identificado este compuesto en otras hortalizas y frutas como, por ejemplo, *Tropaeolum majus* (Wielanek & Urbanek 2006); raíces del rábano blanco (Santhi & Shanthipriya, 2014); repollo (Troncoso *et al.*, 2005); berro (Sharma *et al.*, 2016); mostaza de la india (Olivier *et al.*, 1999); entre otros.

El benceno acetaldehído o benzaldehído, es otro derivado de la glucotropaeolina, con valores comprendidos entre 0.013 - 0.005  $\mu\text{mol/g}$  bs durante el almacenamiento post-cosecha de la mashua; este compuesto es derivado del bencil isotiocianato y el nitrilo de bencil, que a su vez provienen de la transformación de la glucotropaeolina (Mutlib *et al.*, 2002). Por lo tanto, el benceno acetaldehído provendría sólo del bencil isotiocianato, debido a que no se detectó nitrilo de bencil en este estudio. Esta transformación se podría explicar por la acción de la enzima hidroxinitril liasa, la cual libera el HCN y se forma un aldehído (Turpo & Gemio, 2015) característico del benceno acetaldehído. Desde un punto de vista agronómico, el benzaldehído es efectivo como fumigante para cultivos (Lee *et al.*, 2001); y en el caso de la mashua, esta emite altos niveles de benzaldehído en la etapa de floración (Gonzales *et al.*, 2009).

Por otro lado, se evaluó la correlación ( $r$ ) entre los derivados de glucosinolatos y la actividad mirosinasa, mostrando el 4-metoxibencil isotiocianato, 4-metoxibenceno acetnitrilo, (4-metoxibencilalcohol) metil éter, bencil isotiocianato y benceno acetaldehído, tienen como mejor correlación 0.34, 0.32, 0.92, 0.82 y 0.64, respectivamente; siendo mayor la correlación con el (4-metoxibencilalcohol) metil éter y el bencil isotiocianato, hasta el día 6 para ambos casos. Por lo que podemos indicar que, los derivados de los GLS guardaron relación con la actividad mirosinasa de la mashua. Esto a su vez coincide con lo reportado por Kim *et al.* (1997), Lee *et al.* (2017), Lim *et al.* (2015), Hara *et al.* (2001) y Hanschen *et al.* (2017) en rábanos y brócoli que fueron almacenados en frío (0-10°C). Respecto a la correlación entre los derivados de los GLS y el contenido de GLS totales se reportó hasta el día 4 una correlación alta (0.9469). Mientras que otros autores como Hara *et al.* (2001) no encontraron relación para las mismas variables.

Por otro lado, también se observa al comparar la Tabla 5 y la Figura 8 que la menor concentración de derivados se obtuvo el mismo día que se reportó la mayor actividad mirosinasa. Resultado similar fue observado por Piekarska *et al.* (2014) en brotes de brócoli, mostaza y repollo, demostraron que la baja transformación de GLS no presenta relación a la actividad de la mirosinasa. Lo más probable es que esta diversidad de los derivados sean el resultado de la actividad cambiante de enzimas adicionales como proteínas especificadoras o proteínas especificadoras de nitrilo.

#### **4.2. FERMENTACIÓN DE GLUCOSINOLATO DE MASHUA POR ACCIÓN DE LA MIROSINASA DE BACTERIAS LÁCTICAS**

Esta etapa del estudio busca seleccionar una bacteria láctica capaz de utilizar los GLS provenientes de la mashua; para este fin se evaluó la capacidad de cinco bacterias lácticas (dos *Enterococcus* y tres *Lactobacillus*) y una del género *Bifidobacterium*, para degradar los GLS provenientes de mashua. Se evaluó el porcentaje de pérdida de GLS a partir de un medio cultivo conteniendo las bacterias señaladas, y así mismo, la formación de los derivados de los GLS.

##### **4.2.1. EVALUACIÓN DE GLUCOSINOLATOS DE MASHUA EN MEDIOS DE CULTIVO**

Como se ha demostrado en el acápite precedente los GLS son degradados por el complejo mirosinasa vegetal; sin embargo, este complejo puede ser inactivado por diversos factores, por ejemplo, la temperatura durante la cocción. Se ha demostrado que los GLS crucíferos intactos al llegar al colon pueden ser metabolizados por bacterias y por ende producir derivados de fermentación benéficos para el ser humano (Barba *et al.*, 2016; Fujioka *et al.*, 2016). Algunas de las bacterias han mostrado que producen enzimas con actividad similar al complejo mirosinasa vegetal, éstas se encuentran presentes en el intestino distal humano y son capaces de hidrolizar los GLS (Luang-In *et al.*, 2014; Rouzaud *et al.*, 2003). En el caso de estudios *in vitro* se han observado que las bacterias que son capaces de hidrolizar GLS pertenecen a diferentes familias filogenéticas, incluidas las Actinobacterias, Firmicutes y Bacteroides (Brabban & Edwards 1994; Palop *et al.*, 1995).

En este estudio se usó las siguientes bacterias lácticas: *Enterococcus faecium* CWBI- B1430, *Enterococcus mundtii* CWBI-B1431, *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496, *Lactobacillus casei subsp casei* NRRL B-1922, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium bifidum* BIOSTAR<sup>®</sup>, con el fin de seleccionar a la bacteria que degrade *in vitro* a los GLS provenientes del tubérculo de mashua, los cuales han sido identificados y cuantificados inicialmente en este estudio. Para tal fin se procedió a evaluar la transformación, utilizando en el medio de cultivo 10 mmol de GLS totales, por un tiempo de crecimiento de 24 horas para cada bacteria. En la Tabla 6 se observa el porcentaje de GLS degradados, el recuento microbiano obtenido al final de la fermentación (Log UFC/mL) y el valor de pH que se obtuvo después de la fermentación.

La Tabla 6 muestra que después de la fermentación sólo se detectó la glucoaubrietina en los medios de cultivo, mostrándose diferencias significativas entre bacterias (Anexo 14). En el caso de la glucosinalbina y glucotropaeolina se reportaron valores imperceptibles en las seis bacterias, es decir casi la totalidad de estos GLS minoritarios fueron degradados. Por otro lado, se observó que las bacterias que presentaron mayor consumo de GLS totales (Anexo 15) fueron *Lactobacillus rhamnosus* GG con 47.28 por ciento, seguido de la *Bifidobacterium bifidum* BIOSTAR<sup>®</sup> con 36.31 por ciento.

Con respecto a *Lactobacillus casei subsp casei* NRRL B-1922 y *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 presentaron valores de 27.77 y 23.00 por ciento, respectivamente. Diversas investigaciones han reportado el uso de GLS por bacterias lácticas, como, por ejemplo, Cebeci (2017) reportó que *Lactobacillus agilis* R16 consumió 12.4 por ciento de la glucorafanina suministrada al medio. Aljuobori *et al.* (2014) indicaron que la *Lactobacillus salivarius* redujo en un 38 por ciento el contenido de GLS totales a partir de la harina de canola. Nugon-Baudon *et al.* (1990) reportaron que después de 5 días de fermentación, *Lactobacillus acidophilus* degradó la sinigrina entre 13 - 28 por ciento. Mullaney *et al.* (2013) mencionaron que las bacterias lácticas que analizaron, presentan un perfil similar de consumo de GLS, entre 38-51 por ciento de glucorafanina y glucoiberina y 32- 43 por ciento de glucoerucina y glucoiberiverina. Al respecto, en el presente estudio el consumo de GLS totales para lactobacillus se encuentra en el rango de 23 - 47 por ciento (Tabla 6).

**Tabla 6: Porcentaje de consumo de glucosinolatos, recuento microbiano y pH después de la fermentación de glucosinolatos obtenidos a partir de la mashua**

| Bacteria láctica                                    | Consumo (%)    |                  |                         |                         | Log<br>UFC/mL          | pH                   |
|---|----------------|------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|
|   | Glucosinalbina | Glucotropaeolina | Glucoaubrietina         | GLS Totales             |                        |                      |
| <i>Enterococcus faecium</i> CWBI-B1430              | 100±0.00       | 100±0.00         | 17.12±1.19 <sup>c</sup> | 18.04±1.18 <sup>c</sup> | 9.22±0.25 <sup>a</sup> | 4.5±0.0 <sup>a</sup> |
| <i>Enterococcus mundtii</i> CWBI-B1431              | 100±0.00       | 100±0.00         | 8.54±0.44 <sup>f</sup>  | 9.50±0.87 <sup>f</sup>  | 8.95±0.17 <sup>a</sup> | 4.5±0.0 <sup>a</sup> |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> NRRL B-4496          | 100±0.00       | 100±0.00         | 22.12±1.62 <sup>d</sup> | 22.99±1.60 <sup>d</sup> | 9.87±0.85 <sup>a</sup> | 3.5±0.0 <sup>c</sup> |
| <i>Lactobacillus casei subsp casei</i> NRRL B-1922  | 100±0.00       | 100±0.00         | 26.96±2.71 <sup>c</sup> | 27.77±2.68 <sup>c</sup> | 9.00±0.08 <sup>a</sup> | 4.0±0.0 <sup>b</sup> |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG                   | 100±0.00       | 100±0.00         | 46.68±0.57 <sup>a</sup> | 47.28±0.56 <sup>a</sup> | 9.43±0.22 <sup>a</sup> | 3.3±0.3 <sup>c</sup> |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> BIOSTAR <sup>®</sup> | 100±0.00       | 100±0.00         | 35.59±0.71 <sup>b</sup> | 36.31±0.70 <sup>b</sup> | 9.36±0.24 <sup>a</sup> | 3.5±0.0 <sup>c</sup> |

Promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

En contraste, estos valores son inferiores a los reportados por Palani *et al.* (2016) quienes muestran una disminución del 90 por ciento de todos los GLS (glucoiberiverina, progoitrina, neoglucobrasicina y hidroxiglucobrasicina) en el día 5 de la fermentación de chucrut con bacterias lácticas. Igualmente, Daxenbichler *et al.* (1980) demostraron que en las dos primeras semanas todos los GLS durante la fermentación fueron hidrolizados. Por lo tanto, las diferencias del porcentaje de consumo entre bacterias se podrían deber al tipo de GLS, el grado de especificidad de las bacterias y el tiempo, tal como indicó Cebeci (2017) para *Lactobacillus agilis* R16 que no degradó glucorafanina a una velocidad tan alta como la sinigrina, incluso si se realizaba un precultivo en presencia de GLS.

Respecto a las enterobacteriaceae, *Enterococcus faecium* CWBI-B1430 y *Enterococcus mundtii* CWBI-B1431 reportaron porcentajes de consumo de GLS totales de 15.38 y 9.50 por ciento, respectivamente. Estos valores fueron superiores a los reportados por Cebeci (2017) para *Enterococcus casseliflavus* CP1 con un consumo de 7.3 por ciento de glucorafanina. Sin embargo, Mullaney (2013) señalan que las enterobacteriaceae consumieron casi todos los alquilsulfinil GLS, glucorafanina y glucoiberina (81-97 por ciento). Por otra parte, Barillari *et al.* (2007) y Mullaney *et al.* (2013) indicaron que las enterobacteriaceae no metabolizaron los GLS del medio, en su lugar, convierten estos GLS a sus pares reducidos mediante una reacción de reducción, estos se producen para la desintoxicación de compuestos electrofílicos y reactivos. Esto podría explicar el bajo consumo de GLS en las *Enterobacteriaceas*, por lo que probablemente estas bacterias pudieron producir GLS reducidos; sin embargo, no se identificaron en este estudio.

Por otro lado, cuando finalizó la fermentación se midió las unidades formadoras de colonia (UFC). En la Tabla 6, se observó que no existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ , Anexo 16) después de 24 horas de crecimiento en presencia de GLS de mashua; en *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 (9.87 Log UFC/mL), seguido de *Lactobacillus rhamnosus* GG (8.43 Log UFC/mL), *Bifidobacterium bifidum* BIOSTAR® (8.36 Log UFC/mL), *Enterococcus mundtii* CWBI-B1431 (8.28 Log UFC/mL), *Enterococcus faecium* CWBI-B1430 (8.22 Log UFC/mL) y *Lactobacillus casei* subsp *casei* NRRL B-1922 (8.00 Log UFC/mL), respectivamente; demostrando que la presencia de GLS provenientes de mashua no inhibió el crecimiento. Resultados similares fueron reportados por Mullaney *et al.* (2013), donde los GLS de las semillas de brócoli no inhibieron el

crecimiento de bacterias lácticas del género *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Enterococcus*. A diferencia de Brabban & Edwards (1994), quienes señalan que el crecimiento de *Escherichia coli* se vio afectado por los productos del consumo de los GLS de harina de colza. Por lo tanto, la habilidad para tolerar y metabolizar los GLS depende de la cepa o de la especie tal como lo mencionan Cueva *et al.* (2010), Curiel *et al.* (2010), Svensson *et al.* (2010) y Van Beek & Priest (2000).

En cuanto al pH, el medio de cultivo alcanzó al final de las respectivas fermentaciones valores entre 3.3 a 4.5 (Tabla 6, Anexo 17). En los resultados de este estudio pueden encontrarse similitudes con los obtenidos por Broeckx *et al.* (2019) indicando que cuando las bacterias crecieron hasta la fase estacionaria, el pH disminuyó a 3.99 (17 h) y 3.65 (24 h), lo que corresponde al aumento de ácido láctico debido al metabolismo bacteriano durante el crecimiento. Tal como indica Corcoran *et al.* (2004) y Van de Guchte *et al.* (2002), uno de los principales metabolitos de las bacterias lácticas es el ácido láctico, y en consecuencia una disminución del pH; el medio ácido generado puede conducir a un tipo de estrés para la supervivencia de dichas bacterias. En el caso de Cheng *et al.* (2004) menciona que las Bifidobacterias liberan ácido acético y láctico a medida que crecen, causando la disminución del pH del medio, lo cual coincide con los valores reportados en este estudio. Respecto a la influencia de pH y el consumo de los GLS, se observó que las bacterias que consumieron más presentaron bajos valores de pH. Esto coincide con Mullaney *et al.* (2013) quienes indicaron que la enzima con actividad similar a la mirosinasa en las bacterias está influenciada por el bajo valor de pH del medio.

Por otro lado, el valor del pH afecta en gran medida a los productos que se obtienen por el consumo de GLS. Según Hanschen *et al.* (2017) mencionan que el pH ácido (pH 4) y alcalino (pH 8) son óptimos para obtener altas concentraciones de isotiocianato. Asimismo, Hanschen *et al.* (2015) indicaron que, si no hubiera proteínas epitioespecificadora presentes o activas, se esperaría que a pH ácido (pH 4) se favorecería la formación de nitrilo. En nuestro caso, se reportaron bajos valores de pH por lo que se esperaría la presencia de derivados de nitrilos en los medios de cultivo durante la fermentación.

#### 4.2.2. EVALUACIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN DE GLUCOSINOLATOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS LÁCTICAS

En la Tabla 7 se aprecia los derivados del consumo de GLS de las bacterias lácticas que se originaron después de la fermentación en los medios de cultivo enriquecidos con GLS de mashua. Los compuestos que se identificaron después de la fermentación en las seis bacterias fueron 4-metoxibencil isotiocianato, 4-metoxibenceno acetonitrilo, (4-metoxibencilalcohol) metil éter y benceno acetaldehído (Anexo 18).

**Tabla 7: Productos de la transformación de glucosinolatos producidos por bacterias lácticas**

| Bacteria láctica                                       | Contenido (nmol/mL)          |                              |                                    |                          |
|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
|  | 4-Metoxibencil isotiocianato | 4-Metoxibenceno acetonitrilo | (4-Metoxibencilalcohol) metil éter | Benceno acetaldehído     |
| <i>Enterococcus faecium</i><br>CWBI- B1430             | 6.53±0.28 <sup>a</sup>       | 7.04±0.58 <sup>abc</sup>     | 5.72±0.35 <sup>a</sup>             | 10.53±1.41 <sup>d</sup>  |
| <i>Enterococcus mundtii</i><br>CWBI-B1431              | 6.43±0.54 <sup>a</sup>       | 6.53±0.67 <sup>c</sup>       | 5.53±0.20 <sup>a</sup>             | 23.11±0.44 <sup>c</sup>  |
| <i>Lactobacillus plantarum</i><br>NRRL B-4496          | 5.99±0.39 <sup>a</sup>       | 6.11±0.40 <sup>c</sup>       | 5.65±0.14 <sup>a</sup>             | 27.84±0.76 <sup>c</sup>  |
| <i>Lactobacillus casei subsp casei</i> NRRL B-1922     | 5.98±0.65 <sup>a</sup>       | 6.76±0.52 <sup>bc</sup>      | 5.61±0.34 <sup>a</sup>             | 44.44±5.57 <sup>a</sup>  |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i><br>GG                   | 5.84±0.27 <sup>a</sup>       | 8.08±0.52 <sup>ab</sup>      | 5.52±0.09 <sup>a</sup>             | 41.10±1.52 <sup>ab</sup> |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i><br>BIOSTAR <sup>®</sup> | 5.78±0.29 <sup>a</sup>       | 8.22±0.13 <sup>a</sup>       | 5.37±0.13 <sup>a</sup>             | 36.35±3.86 <sup>b</sup>  |

Promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ )

Respecto al 4-metoxibencil isotiocianato, derivado de la glucoaubrietina, GLS más abundante en el tubérculo de la mashua (81.01 por ciento de GLS totales, Tabla 6), no presentó diferencias significativas en las seis bacterias (Anexo 19); además, se observó valores entre 6.53 a 5.78 nmol/mL, inferiores a los otros derivados. Por otro lado, se detectó el 4-metoxibenceno acetonitrilo y (4-metoxibencilalcohol) metil éter como posibles productos derivados de glucoaubrietina. En la Tabla 7, se observa que existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el contenido de 4-metoxibenceno acetonitrilo (Anexo 20) a diferencia de (4-metoxibencilalcohol) metil éter, que no presentó diferencias significativas (Anexo 21). Las bacterias que produjeron mayor contenido de 4-metoxibenceno acetonitrilo fueron *Bifidobacterium bifidum* BIOSTAR<sup>®</sup>, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Enterococcus faecium* CWBI- B1430 (8.22, 8.08 y 7.04 nmol/mL, respectivamente). Esto se podría explicar debido a que las bacterias lácticas presentan una actividad dominante de sulfatasa y  $\beta$ -O-glucosidasa y, por lo tanto, metabolizan los GLS a nitrilo en lugar de isotiocianato (Luang-In *et al.*, 2016), explicando así la mayor producción de 4-metoxibenceno acetonitrilo, a comparación de los otros derivados de glucoaubrietina.

Como se ha mencionado anteriormente, el 4-metoxibencil isotiocianato, 4-metoxibenceno acetonitrilo y (4-metoxibencilalcohol) metil éter son los derivados de la glucoaubrietina durante la fermentación, demostrando que este GLS es el que se transforma más durante la fermentación. La bacteria que degradó en mayor cantidad ese GLS en sus derivados fue *Lactobacillus rhamnosus* GG obteniéndose un total de 19.44 nmol/g respecto a los tres derivados provenientes de la glucoaubrietina. Esto puede ser relacionado con lo reportado por diversos autores (Tsangalis *et al.*, 2002; Hyun *et al.*, 2006; McConnell & Tannock, 1991) que señalan que *Lactobacillus rhamnosus* HN001 posee una gran actividad de  $\beta$ -glucosidasa siendo capaces de hidrolizar varios glucósidos.

En relación a los derivados de la glucotropaeolina, el segundo GLS más abundante en la mashua (18.15 por ciento respecto al total promedio de GLS), sólo se detectó el benceno acetaldehído (bencilo acetonitrilo) como su posible producto derivado, siendo este compuesto el que más destacó entre todos los derivados de glucosinolatos, mostrando diferencias significativas (Anexo 22) entre las bacterias evaluadas. Las bacterias que produjeron mayor cantidad de ese compuesto fueron *Lactobacillus casei subsp casei*



NRRL B-1922 seguido de *Lactobacillus rhamnosus* GG, con 44.44 y 41.10 nmol/mL, respectivamente. Además, se observó que los *Lactobacillus* presentaron mayores cantidades de benceno acetaldehído, a diferencia de las *Enterobacterias*, esto se podría deberse a diferentes enzimas y mecanismos involucrados en el metabolismo de las bacterias.

En cuanto, a los derivados de la glucosinalbina durante la fermentación, no se detectó ningún derivado después de la fermentación, resultado similar a lo obtenido durante el tratamiento post-cosecha de la mashua; podríamos señalar que estos derivados debieron ser entre otros, el 2-(4-hidroxifenil) acetonitrilo (Radojčić *et al.*, 2008) y el 4-hidroxibencil isotiocianato (Blažević *et al.*, 2019). Sin embargo, en la Tabla 6 observamos que no se detecta la glucosinalbina al final de la fermentación, por lo tanto, existe la posibilidad que este GLS con ayuda de la metil transferasa se haya transformado en glucoaubrietina tal como lo señala Ortega *et al.* (2006).

### **4.3. EVALUACIÓN DE LA FERMENTACIÓN DE GLUCOSINOLATOS DE MASHUA EN PRESENCIA DE *Lactobacillus rhamnosus* GG**

En base a la evaluación de la capacidad de utilizar los GLS provenientes de mashua por seis bacterias lácticas (acápite 4.4.), se seleccionó la bacteria que mostró mayor capacidad de consumo de los GLS esta fue el *Lactobacillus rhamnosus* GG.

#### **4.3.1. EVALUACIÓN DEL CONSUMO GLUCOSINOLATOS CON *Lactobacillus rhamnosus* GG DURANTE LA FERMENTACIÓN**

En la presente investigación se evaluó el porcentaje de consumo de los GLS de mashua a tres concentraciones (0.01, 0.05 y 0.1 por ciento) en los medios de cultivo a diferentes tiempos de fermentación (6, 24, 30, 48 y 54 h) por *Lactobacillus rhamnosus* GG, estos resultados son mostrados en la Tabla 8.

**Tabla 8: Porcentaje de consumo de glucosinolatos de mashua con *Lactobacillus rhamnosus* GG durante la fermentación**

| Tiempo (h) | Consumo (%)               |                           |                            |
|------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
|            | 0.01% GLS                 | 0.05% GLS                 | 0.1% GLS                   |
| <b>6</b>   | 23.30±1.18 <sup>hi</sup>  | 20.55±1.33 <sup>i</sup>   | 14.87±1.45 <sup>j</sup>    |
| <b>24</b>  | 22.69±0.42 <sup>fgh</sup> | 37.86±1.52 <sup>bc</sup>  | 27.10±1.48 <sup>fgh</sup>  |
| <b>30</b>  | 29.62±1.42 <sup>fg</sup>  | 24.58±1.81 <sup>ghi</sup> | 37.61±1.52 <sup>bc</sup>   |
| <b>48</b>  | 30.46±1.60 <sup>ef</sup>  | 36.53±0.40 <sup>bcd</sup> | 31.93 ±0.73 <sup>def</sup> |
| <b>54</b>  | 41.29±3.96 <sup>ab</sup>  | 35.07±1.91 <sup>cde</sup> | 45.70±2.64 <sup>a</sup>    |

Promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ )

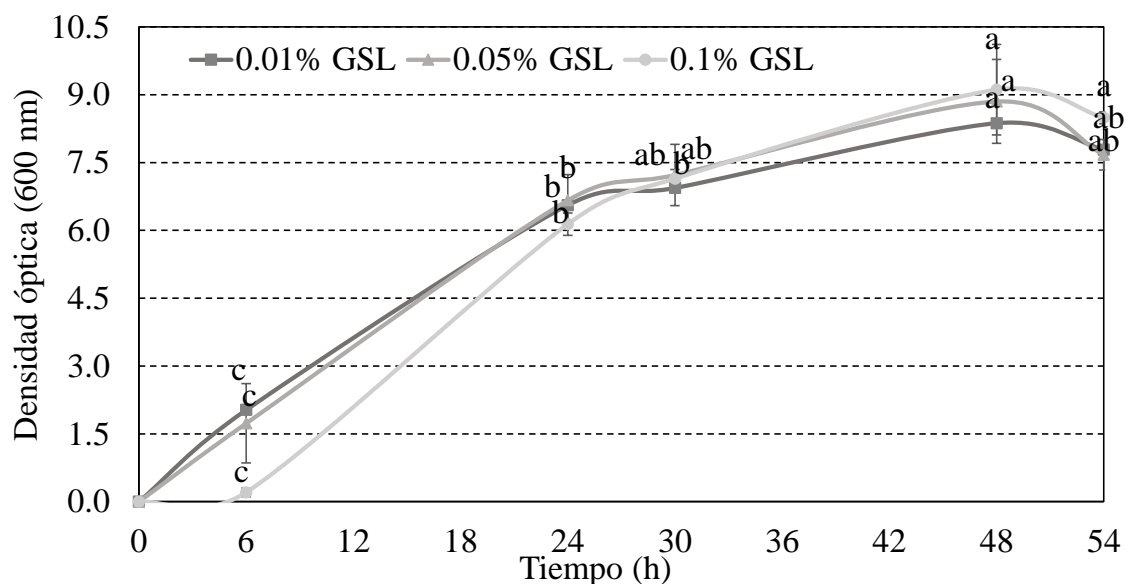
Como se mencionó anteriormente, el *Lactobacillus rhamnosus* GG obtuvo mayor consumo de GLS a diferencia de las otras bacterias lácticas que se estudiaron. Los resultados de la Tabla 8 muestran que a la concentración de GLS más baja evaluada (0.01 por ciento) se observó diferencias significativas ( $p < 0.05$ , Anexo 23) en los tiempos evaluados y un comportamiento ascendente durante la fermentación, alcanzándose 41.29 por ciento de consumo a las 54 horas. En el caso de la concentración intermedia (0.05 por ciento), observa valores fluctuantes en el tiempo con diferencias significativas (Anexo 23); sin embargo, el menor y mayor consumo fue a las 6 y 24 horas, con 20.55 y 37.86 por ciento, respectivamente. Respecto a la concentración de GLS más alta estudiada (0.1 por ciento) mostró el menor consumo a las 6 horas, alcanzando el máximo consumo a las 54 horas. En este sentido, las variaciones de resultados en los porcentajes de consumo de GLS durante el tiempo de fermentación podrían atribuirse en primera instancia a la cantidad de sustrato inicial en el medio de fermentación, por ejemplo, a las 6 horas la

concentración más baja presenta el mayor consumo, es decir mayor velocidad de consumo, en comparación a la de mayor concentración. La presencia de metabolitos como los ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido fórmico, ácido succínico y ácido cítrico, entre otros) productos del crecimiento de bacterias ácido lácticas como el *Lactobacillus rhamnosus* GG, tal como lo menciona Kocková *et al.* (2013), pudieron influir en el consumo de los GLS. Al respecto, algunos estudios han destacado que varias bacterias ácido lácticas presentaron mejoras en los niveles de enzimas glicolíticas bajo estrés ácido, térmico y osmótico (Di Cagno *et al.*, 2006; Marceau *et al.*, 2002). Además, Li *et al.* (2011) mencionan que las bacterias pertenecientes a diferentes familias filogenéticas han generado genes para expresar la glucosidasa, la cual es utilizada para liberar glucosa de moléculas complejas en el entorno intestinal para la utilización de energía. En el caso de la concentración más alta de GLS utilizada, presentó el mayor consumo, podría explicarse al estrés debido a la presencia de GLS y sus derivados; así como de otros metabolitos (por ejemplo, ácidos) que ocasionaron mayores niveles de esta enzima produciendo mayor consumo.

Respecto a los resultados mostrados en la Tabla 8, se observa a las 6 horas un consumo similar a lo reportado por Nugon-Baudon *et al.* (1990) para *Lactobacillus* (LEM) después de 5 días de fermentación, 18 a 28 por ciento. Así mismo, a las 6 horas, fue superior a lo obtenido para *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* y *Pedococcus pentosaceus* con 2.4 a 5.4, 0.6 a 4 y 5.02 a 11.3 por ciento, respectivamente, a 6 horas de fermentación (Luciano *et al.*, 2011). En cuanto a los valores reportados en este estudio después de las 24 horas se encontró dentro del rango de Mullaney *et al.* (2013) con 30 a 33 por ciento de consumo para *Lactobacillus plantarum* KW30 y *Lactococcus lactis subsp lactis* KF147. Por el contrario, fue inferior a lo reportados por Lai *et al* (2009) para *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. plantarum*, entre 36 y 49 por ciento después de 24 horas de fermentación. A las 48 horas de evaluación se observó mayor consumo a diferencia de Oginsky *et al.* (1965) que reportó en *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Staphylococcus epidermidis* valores que oscilaron entre 26, 28 y 19 por ciento, respectivamente, después de 48 horas de incubación. En síntesis, estas variaciones con otras bacterias, nos indican que el consumo de los GLS, es dependiente del filogenética de la bacteria, el tiempo de fermentación, el tipo de GLS, entre otros factores.

#### 4.3.2. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus rhamnosus* GG EN MEDIOS DE CULTIVOS CON GLUCOSINOLATOS DURANTE LA FERMENTACIÓN

Respecto al crecimiento microbiano, a las diferentes concentraciones y tiempos de fermentación, las Figuras 9 y 10 muestran el incremento de la biomasa ( $DO_{600}$ , Anexo 24) y el crecimiento logarítmico (Log UFC/mL, Anexo 25) para las tres concentraciones de GLS de mashua (0.01, 0.05 y 0.1 por ciento) durante la fermentación en condiciones anaeróbicas.



**Figura 9: Curvas de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* GG en medios de cultivo con glucosinolatos (0.01, 0.05 y 0.1 %) durante la fermentación**

Promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes en la misma curva indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ )

En la Figura 9 se observa la producción de biomasa microbiana en presencia de diferentes concentraciones de GLS de mashua. A las 6 horas se observó menor contenido de biomasa, pero mayor velocidad de crecimiento excepto para la concentración más alta (0.1 por ciento), después de este tiempo la velocidad de crecimiento disminuye

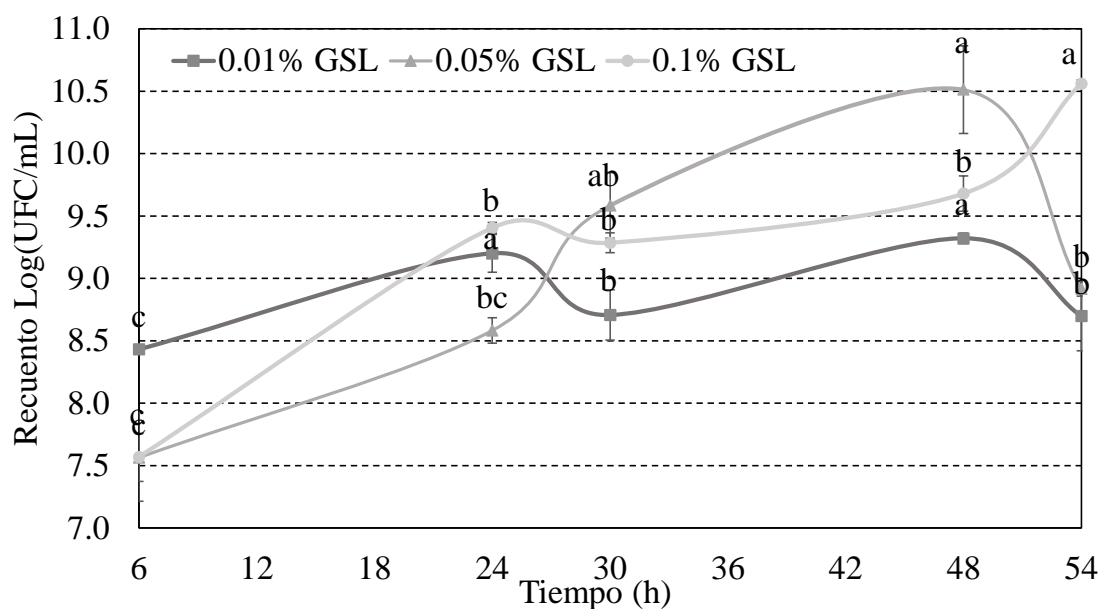
gradualmente, alcanzando menor velocidad entre 24 y 48 horas. Por otro lado, se observa incremento de biomasa hasta las 48 horas, obteniéndose 9.11, 8.85 y 8.37 de densidad óptica máxima para 0.1, 0.05 y 0.01 por ciento, respectivamente.

Inicialmente las células crecen por el consumo de nutrientes simples como es la glucosa, aminoácidos, entre otros y posteriormente, cuando se acaba el sustrato entran a una fase de retraso a las 30 horas, con el fin de adaptarse para empezar a consumir los GLS de la mashua, tal como lo explican Pyo *et al.* (2005) y Tan *et al.* (2017) que mencionan que en los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa incrementaría en la fase estacionaria debido a la disminución del suministro de nutrientes.

Además, Chu (2015) y Hermsen *et al.* (2015) reportaron que en los medios que presentan dos fuentes de nutrientes (en este caso, carbohidratos) y uno de ellos es más accesible a comparación del otro, existe una absorción secuencial permitiendo maximizar el crecimiento en entorno de los nutrientes duales, este comportamiento se representa en curvas denominadas diauxica. En este caso se podría decir que hasta las 24 horas en las tres concentraciones se consume la glucosa del medio y después de las 30 horas comenzaría el consumo del GLS de la mashua, esto debido a la disminución de la velocidad de crecimiento ( $\Delta$  DO).

Respecto a la Figura 10 (Anexo 25) durante el estudio realizado también se evaluó el recuento microbiano, la concentración intermedia (0.05 por ciento) fue la que presentó valores más altos durante las 48 horas, respecto a las otras dos concentraciones evaluadas (0.05 y 0.01 por ciento). Los resultados indican que la concentración intermedia presentó el mayor valor después de 48 horas con 10.51 Log UFC/mL, del mismo modo que la concentración baja con 9.57 Log UFC/mL. Mientras que el número viable de células en la concentración alta se reportó después de las 54 horas con 10.24 Log UFC/mL, respectivamente. Esta diferencia en los máximos de células viables, podría ser explicado por la adaptación de las células a la concentración elevada de GLS. Al respecto, Begovic *et al.* (2010) mencionan que, dependiendo del medio de crecimiento utilizado para el cultivo de la bacteria, los valores finales del recuento de células variaron. En este sentido, como consecuencia del estrés, las células disminuyen sus actividades metabólicas, lo que disminuye la producción de energía, generación de una fuerza motriz de protones,

alterando el crecimiento y la viabilidad (Even *et al.*, 2002 y Konings *et al.*, 1997). Estas diferentes capacidades para metabolizar serían respuesta a los cambios fisiológicos que experimentan las bacterias lácticas.



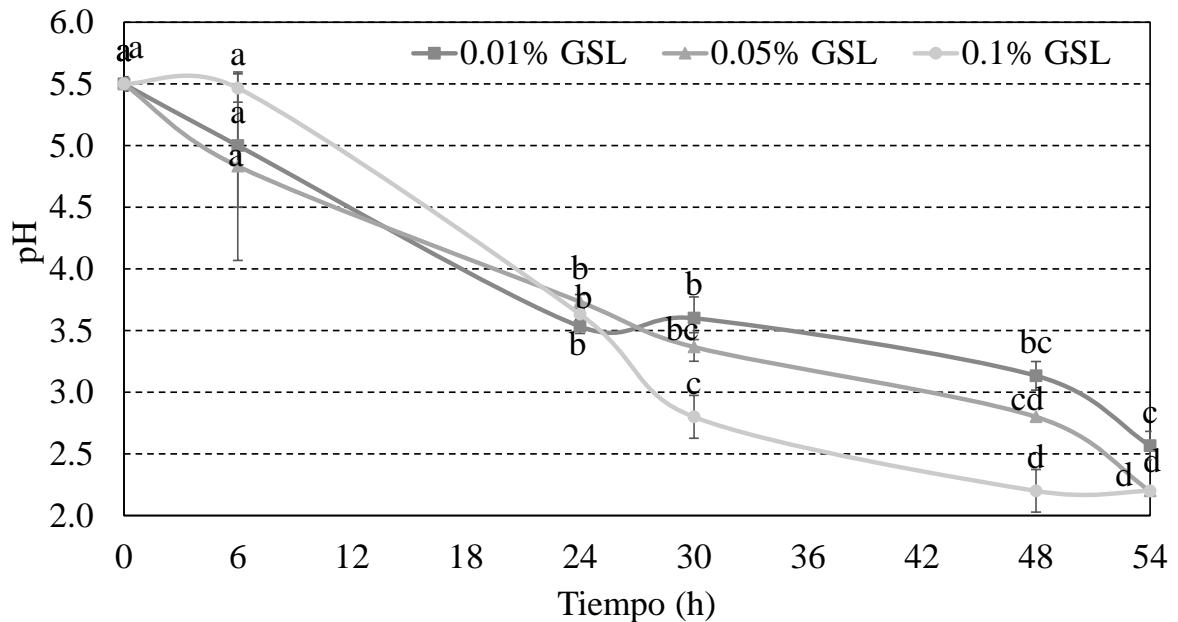
**Figura 10: Recuento de *Lactobacillus rhamnosus* GG incubado en medios de cultivo con glucosinolatos (0.01, 0.05 y 0.1 %) durante la fermentación**

Promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes en la misma curva indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ )

#### 4.3.3. DETERMINACIÓN DEL pH DE MEDIOS DE CULTIVO CON *Lactobacillus rhamnosus* GG EN PRESENCIA DE GLUCOSINOLATOS DURANTE LA FERMENTACIÓN

En la Figura 11 (Anexo 26) se observa una rápida disminución del pH a las 6 horas, en las concentraciones de 0.01 y 0.05 por ciento, después la disminución se enlentece hasta las 24 horas. En el caso de la concentración 0.01 por ciento se observa un aumento, a diferencia de la concentración 0.05 por ciento que disminuye hasta las 54 horas. En relación a la concentración 0.1 por ciento se observa una disminución continua hasta las 54 horas. Respecto a la disminución de pH, Anuradha *et al* (1999) nos menciona que *Lactobacillus rhamnosus* es un organismo microaerofílico que produce principalmente

lactato, acetato, diacetilo y acetoina. Si comparamos la Figura 11 y 9, se observa un crecimiento reducido a pH bajos tal fue reportado para *Lactobacillus. rhamnosus* BTK 20-12 que presentó crecimiento reducido a pH de 2 a 4 (Tkhruni *et al.*, 2020).



**Figura 11: Determinación del pH durante la fermentación de *Lactobacillus rhamnosus* GG incubado en 0.01, 0.05 y 0.1 % de GLS**

Promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes en la misma curva indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ )

Por otro lado, se ha reportado que el estrés ácido modifica el metabolismo de los carbohidratos como por ejemplo en *Lactobacillus reuteri*, donde la fosfoglicerato mutasa, enolasa y maltosa fosforilasa, entre otras enzimas, se adaptaron al pH ácido en comparación con el pH óptimo de crecimiento, 6.8 (Lee *et al.*, 2008). Así mismo, en bacterias potencialmente probióticas (*Lactobacillus casei* Zhang) el repentino choque ácido (pH 2.5) provocó la inducción de varias proteínas del metabolismo de los carbohidratos con el fin de resistir las condiciones de estrés ácido (Wu *et al.*, 2011). En estudios de lactobacilos, varias proteínas glicolíticas, incluida la fosfogliceratomutasa, fosfoglicerato quinasa, enolasa, piruvato quinasa y fructosa bisfosfato aldolasa, han demostrado ser más abundante en respuesta a condiciones de estrés ácido (Lee *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2011). Según Koponen *et al.* (2012) y Zhai *et al.*

(2014) el *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Lactobacillus. rhamnosus* en condiciones de estrés ácido inducen las enzimas tales como piruvato oxidasa y fosfato acetiltransferasa que son utilizados para sintetizar acetil-coenzima A. En el caso de Koponen *et al.* (2012) señalan que *Lactobacillus rhamnosus* GG en condiciones de crecimiento ácidas presentan cantidades altas como bajas de las proteínas del metabolismo de los carbohidratos, por ejemplo, modula el metabolismo del piruvato en función del pH de crecimiento. En este caso, algunas de estas enzimas probablemente se produjeron al disminuir el pH a generando un mejor metabolismo de los GLS.

#### **4.3.4. EVALUACIÓN DE LOS DERIVADOS DE LOS GLUCOSINOLATOS EN MEDIOS DE CULTIVO CON *Lactobacillus rhamnosus* GG DURANTE LA FERMENTACIÓN**

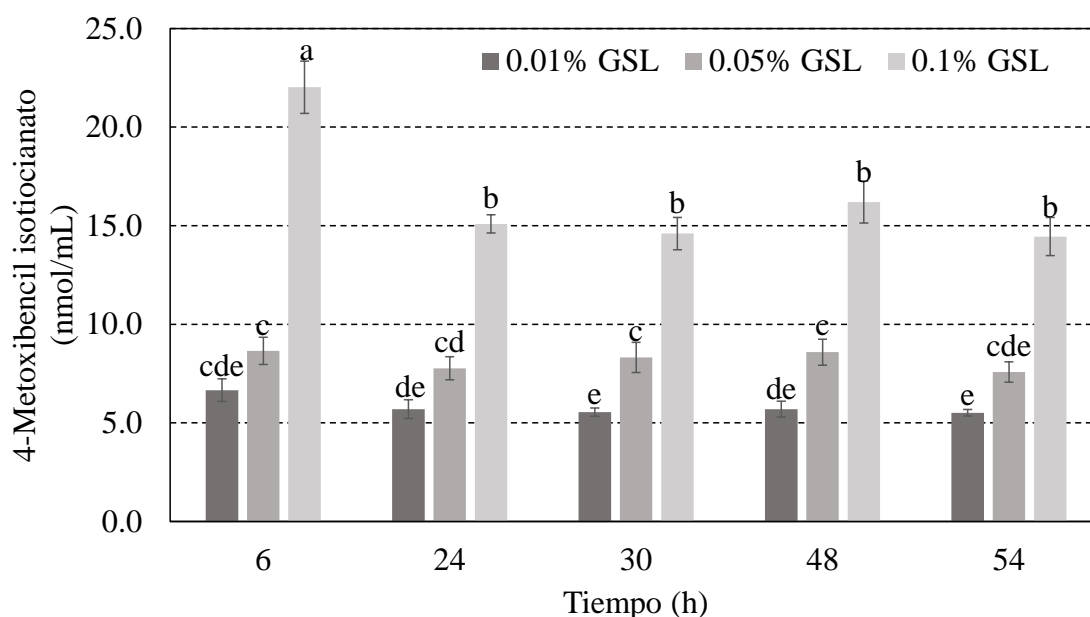
En las siguientes Figuras 12, 13, 14 y 15 se observan los productos del consumo de GLS durante el crecimiento de la *Lactobacillus rhamnosus* GG, se identificaron, 4-metoxibencil isotiocianato, 4-metoxibenceno acetonitrilo, (4-metoxibencilalcohol) metil éter y benceno acetaldehído para cada concentración de GLS en estudio (0.01, 0.05 y 0.1 por ciento) a diferentes tiempos.

En relación al 4-metoxibencil isotiocianato es el producto del consumo de la glucoaubrietina. En la Figura 12 (Anexo 27) se observa el 4-metoxibencil isotiocianato, que se obtuvo a partir del metabolismo de la *Lactobacillus rhamnosus* GG en presencia de GLS de mashua a 0.01, 0.05 y 0.1 por ciento de concentración durante el transcurso del tiempo.

Como se puede apreciar en la Figura 12 después de las 6 horas no existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la concentración de 0.1 por ciento. Respecto a la concentración 0.05 y 0.01 por ciento se observa un contenido similar para todos los tiempos. La concentración 0.1 por ciento presentó la mayor cantidad de 4-metoxibencil isotiocianato a las 6 horas, 22.02 nmol/mL; sin embargo, después disminuyó con el tiempo. Por lo tanto, el 4-metoxibencil isotiocianato disminuye o se mantiene constante en el tiempo, dependiendo la concentración de GLS en el medio. Probablemente se deba a que los compuestos en el medio podrían reaccionar con cualquier compuesto del medio y, por



consiguiente, se obtendrían pérdidas del isotiocianato en los medios de cultivo (Lai *et al.*, 2010 y Tang *et al.*, 1972). Esto se debe a que no contienen un carbono altamente electrofílico, como es el caso de los isotiocianatos (-NCS) es por ello que todas las concentraciones de isotiocianatos disminuyeron gradualmente con el tiempo (Luang-In *et al.*, 2014).

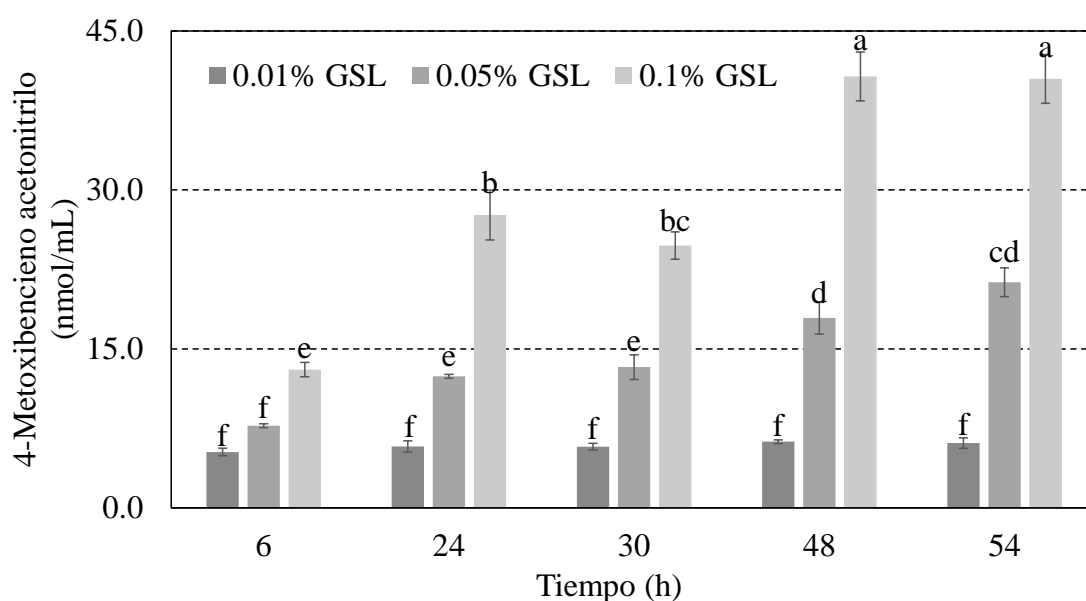


**Figura 12: 4-Metoxibencil isotiocianato generado a partir del metabolismo de la *Lactobacillus rhamnosus* GG en presencia de glucosinolato de mashua a 0.01, 0.05 y 0.1 por ciento de concentración durante la fermentación**

Promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas para la interacción de factores ( $p < 0.05$ ) entre todas las muestras.

Otro derivado de la glucoaubrietina durante la fermentación es el 4-metoxibencil acetonitrilo, es posible que este sean el resultado de la transformación del 4 metoxibencil isotiocianato; por otro lado, Luang-In *et al.* (2014) indicaron que la sulfatasa bacteriana podría ser capaz de desulfatar el GLS para producir desulfo-GLS (DS-GLS), que es un precursor del producto nitrilo. Como se puede apreciar en la Figura 13 (Anexo 28) no existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la concentración de 0.01 por ciento. Respecto a la concentración 0.05 por ciento se observa un comportamiento constante hasta las 30 horas. Estos comportamientos coincidieron con lo reportado por Luang-In *et al.* (2015) y Mays *et al.* (2008) que mencionan que los nitrilos son menos lábiles a

comparación de los isotiocianatos; por lo tanto, la producción de nitrilos se mantiene estable. Del mismo modo Luang-In *et al.* (2016) afirman que la producción de nitrilos aumentó y se mantuvo bastante constante o disminuyó ligeramente dependiendo de los tipos de GLS y bacteria. En el caso de la concentración 0.1 por ciento se observa que el 4-metoxibencil acetónitrilo aumenta hasta las 54 horas. Este comportamiento se podría deber a que un medio de ácido tiende a formar nitrilos (Matusheski *et al.*, 2001). Comparando la Figura 11 y 13 se observa que, durante las 48 y 54 horas, se presenta bajos niveles de pH, a diferencia de las otras concentraciones. En síntesis, los productos formados dependen de las condiciones de hidrólisis del medio.

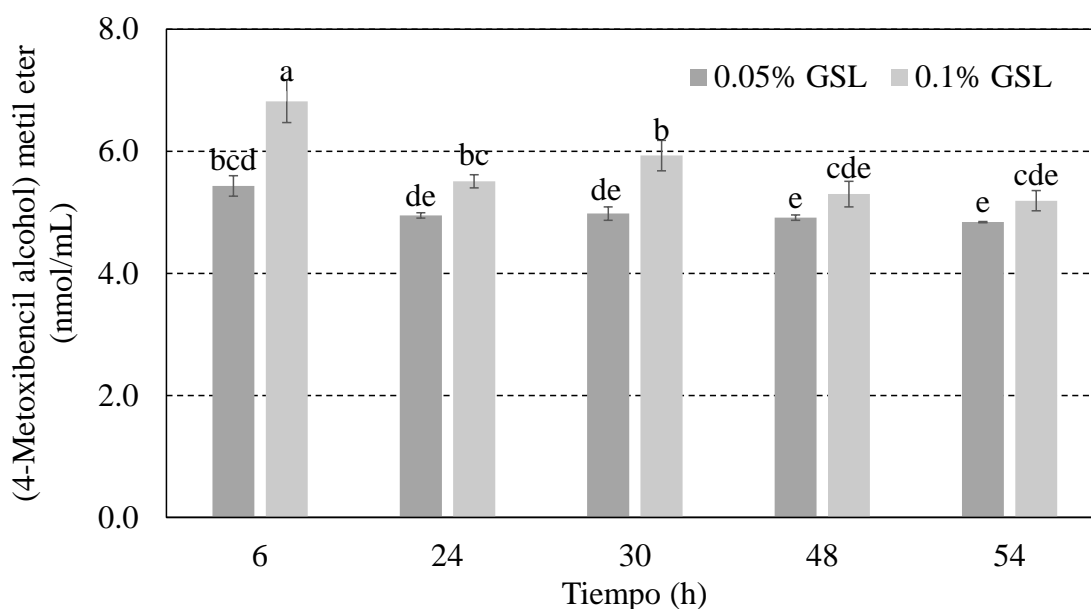


**Figura 13: 4-Metoxibenceno acetónitrilo generado a partir del metabolismo de la *Lactobacillus rhamnosus* GG en presencia de glucosinolato de mashua a 0.01, 0.05 y 0.1 por ciento de concentración**

Promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas para la interacción de factores ( $p < 0.05$ ) entre todas las muestras.

Respecto a otro producto del consumo de la glucoaubrietina probablemente es (4-metoxibencilalcohol) metil éter. Es posible que este derivado sea el resultado de la transformación del 4 metoxibencil isotiocianato Al igual que los anteriores productos se obtuvo a partir del metabolismo de la *Lactobacillus rhamnosus* GG en presencia de GLS de mashua a 0.01, 0.05 y 0.1 por ciento de concentración durante un transcurso de tiempo.

En la Figura 14 (Anexo 2) se observa que no se detectó el (4-metoxibencilalcohol) metil éter en la concentración 0.01 por ciento. A diferencia de las concentraciones 0.05 y 0.1 por ciento que si se detectaron, las cuales presentan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).



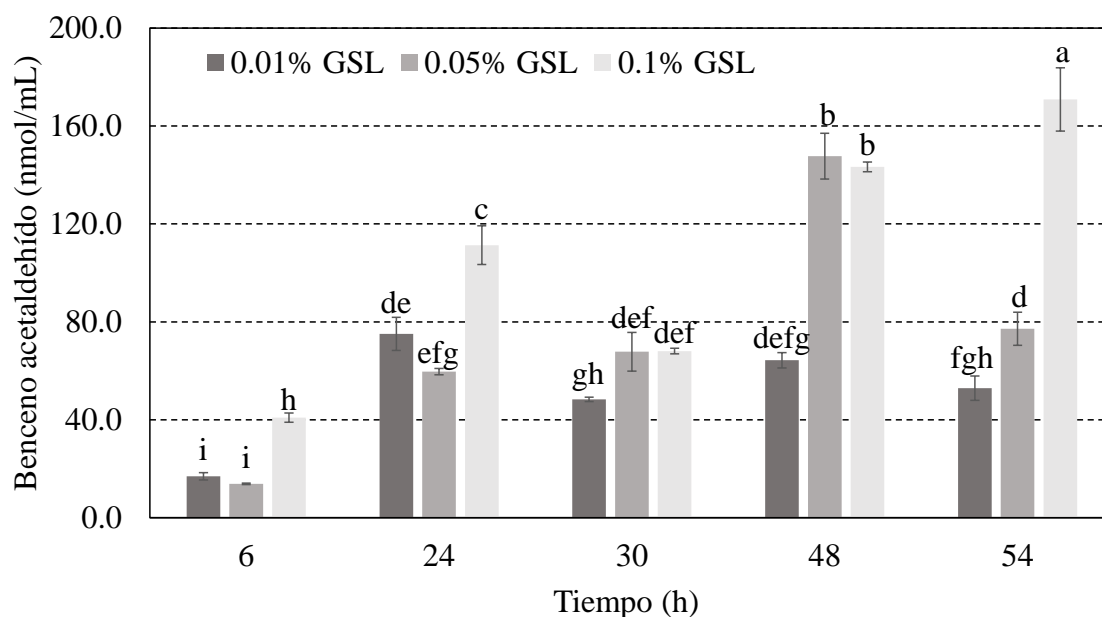
**Figura 14: (4-Metoxibencilalcohol) metil éter generado a partir del metabolismo de la *Lactobacillus rhamnosus* GG en presencia de glucosinolato de mashua a 0.05 y 0.1 por ciento de concentración**

Promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas para la interacción de factores ( $p < 0.05$ ) entre todas las muestras.

Por último, dentro de los productos del consumo que se detectaron tenemos el benceno acetaldehído (Anexo 30) fue el que más destacó en comparación a los demás productos. Es posible que este derivado sea el resultado de la transformación del bencil isotiocianato. Siendo este compuesto el producto del consumo de la glucotropaeolina, este GLS es el segundo GLS en contenido que se identificó en la mashua (18 por ciento respecto al contenido total de GLS).

En la Figura 15 se observa el benceno acetaldehído que se obtuvo a partir del metabolismo de la *Lactobacillus rhamnosus* GG en presencia de GLS de mashua a 0.01, 0.05 y 0.1 por ciento de concentración durante un transcurso de tiempo. En relación a la concentración de 0.01 por ciento se observa un comportamiento oscilante con valores que se encuentra

en un rango de 16.91 a 64.30 nmol/mL. Respecto a la concentración 0.05 por ciento se observa un incremento a las 48 horas de 147.64 nmol/mL. Mientras que en la concentración 0.1 por ciento se reportó mayor producción de benceno acetaldehído a las 54 horas de 170.87 nmol/mL. En resumen, se observa que a mayor concentración de GLS presenta mayores cantidades de benceno acetaldehído.



**Figura 15: Benceno acetaldehído generado a partir del metabolismo de la *Lactobacillus rhamnosus* GG en presencia de GLS de mashua a 0.01, 0.05 y 0.1 por ciento de concentración**

Promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas para la interacción de factores ( $p < 0.05$ ) entre todas las muestras.

Por otro lado, durante las fermentaciones con *Lactobacillus rhamnosus* GG no se detectó derivados de la glucosinalbina, tercer compuesto que se identificó en los GLS de la mashua. Cabe resaltar que este GLS presenta bajas concentraciones, por lo que es probable que la ausencia de ese producto no sea perceptible. Al igual que reportó Luang-In *et al.* (2014) mencionaron que no se detectaron productos de hidrólisis para el metabolismo de glucoiberina y glucorafanina por *Lactobacillus agilis* R16.

En relación a investigaciones realizadas en bacterias lácticas en *Lactobacillus agilis* R16 reportaron los siguientes productos del consumo de: alilisotiocianato, alilnitrilo (Palop *et al.* 1995 y Luang-In *et al.* 2016), erucin, erucin de nitrilo (Luang-In *et al.* 2014), bencil isotiocianato, bencil de nitrilo (Luang-In *et al.* 2016) y fenilisotiocianato (Luang-In *et al.* 2016). En el caso de *Lactobacillus plantarum* KW30 indicaron los siguientes productos sulfarrafano de nitrilo, iberberina de nitrilo y erucina de nitrilo (Mullaney *et al.*, 2013). Según Lai *et al.* (2009) en la *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* detectaron solo el sulforrafano nitrilo como producto del consumo. Por último, en un estudio de Mullaney *et al.* (2013) con *Lactococcus lactis subsp lactis* KF147 reportó sulforrafano de nitrilo, iberberina de nitrilo y erucin. Por lo que, dependiendo del GLS, bacteria y metabolismo se obtendrán diferentes productos del consumo.

## V. CONCLUSIONES

1. El estrés abiótico post-cosecha a condiciones controladas durante un periodo de 12 días influyó significativamente ( $p < 0.05$ ) en el contenido y perfil de glucosinolatos de la mashua, actividad mirosinasa y derivados de glucosinolatos. Así mismo, se mostró que la actividad mirosinasa no influyó en el contenido de glucosinolatos.
2. El metabolismo de cada bacteria láctica influyó en el consumo de glucosinolatos de mashua; las bacterias que fermentaron más a los glucosinolatos (*L. rhamnosus* y *B. bifidum*), presentaron mayor crecimiento y bajos valores de pH al final de la fermentación. El género *Lactobacillus*, mostró mayor afinidad por los glucosinolatos de mashua respecto a los *Enterococcus*.
3. Las concentraciones de glucosinolatos en el medio de cultivo y el tiempo de fermentación influyeron en el porcentaje consumido, crecimiento microbiano y en los derivados de la fermentación. El *Lactobacillus rhamnosus* alcanzó el mayor consumo siendo de 46 por ciento a una concentración de 0.1 por ciento después de 54 h de fermentación. Respecto al crecimiento microbiano y recuento microbiano, se reportó para las tres concentraciones de glucosinolatos evaluadas un aumento significativo hasta las 48 h. Se observó una relación directa entre la cantidad total de derivados de la fermentación y la concentración de GLS, del mismo modo para el tiempo de fermentación.
4. Las bacterias lácticas probióticas como *L. rhamnosus*, *B. bifidum* y *L. casei*, que podrían estar colonizando el tracto gastrointestinal humano, serían capaces de utilizar los GLS intactos provenientes de mashua y producir los siguientes derivados de los glucosinolatos: 4-metoxibencil isotiocianato, 4-metoxibenceno acetónitrilo, (4-metoxibencilalcohol) metil éter y benceno acetaldehído, que serían aprovechados en beneficio del consumidor.

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar la identificación y caracterización del complejo mirosinasa de la mashua y de las enzimas tipo mirosinasa provenientes de *Lactobacillus rhamnosus* GG.
- Evaluar el efecto de los iones metálicos durante la fermentación de *Lactobacillus rhamnosus* GG en el perfil de derivados glucosinolatos de la mashua.
- Identificar y cuantificar los derivados de glucosinolatos de la mashua *in vivo*.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, A. C., Borges, A., Simões, L. C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (september, 2013). Antibacterial activity of phenyl isothiocyanate on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Medicinal Chemistry*, 9(5), 756-761. Recuperado en: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/25735/1/Abreu%20AC%20et%20al.%2C%202013.Antibacterial%20Activity%20of%20Phenyl%20Isothiocyanate%20on%20Escherichia%20coli%20and.pdf>
- Adesida, A., Edwards, L. G., & Thornalley, P. J. (november, 1996). Inhibition of human leukaemia 60 cell growth by mercapturic acid metabolites of phenylethyl isothiocyanate. *Food and chemical toxicology*, 34(4), 385-392. doi:10.1016/0278-6915(96)00124-x
- Agboola, O., Maree, J., & Mbaya, R. (february, 2014). Characterization and performance of nanofiltration membranes. *Environmental chemistry letters*, 12(2), 241-255. doi: 10.1007/s10311-014-0457-3
- Agerbirk, N., & Olsen, C. E. (march, 2012). Glucosinolate structures in evolution. *Phytochemistry*, 77, 16-45. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.02.005
- Albaser, A., Kazana, E., Bennett, M. H., Cebeci, F., Luang-In, V., Spanu, P. D., & Rossiter, J. T. (june, 2016). Discovery of a bacterial glycoside hydrolase family 3 (GH3)  $\beta$ -glucosidase with myrosinase activity from a *Citrobacter* strain isolated from soil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(7), 1520-1527. doi: 10.1021/acs.jafc.5b05381



- Alcalde-Eon, C., Saavedra, G., de Pascual-Teresa, S., & Rivas-Gonzalo, J. C. (october, 2004). Liquid chromatography–mass spectrometry identification of anthocyanins of isla oca (*Oxalis tuberosa*, Mol.) tubers. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 211-215. doi: 10.1016/j.chroma.2004.08.074
- Alia-Tejagal, I., Villanueva-Arce, R., Pelayo-Zaldívar, C., Colinas-León, M. T., López-Martínez, V., & Bautista-Baños, S. (december, 2007). Postharvest physiology and technology of sapote mamey fruit (*Pouteria sapota* (Jacq.) HE Moore & Stearn). *Postharvest Biology and Technology*, 45(3), 285-297. doi: 10.1016/j.postharvbio.2006.12
- Aljuobori, A., Abdullah, N., Zulkifli, I., Soleimani, A. F., Liang, J. B., & Oskoueian, E. (july, 2014). *Lactobacillus salivarius* fermentation reduced glucosinolate and fibre in canola meal. *Journal of Food Research*, 3(5), 95. doi:10.5539/jfr.v3n5p95
- Andersson, D., Chakrabarty, R., Bejai, S., Zhang, J., Rask, L., & Meijer, J. (august, 2009). Myrosinases from root and leaves of *Arabidopsis thaliana* have different catalytic properties. *Phytochemistry*, 70(11-12), 1345-1354. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.07.036
- Andréasson, E., Jørgensen, L. B., Hoglund, A. S., Rask, L., & Meijer, J. (december, 2001). Different myrosinase and idioblast distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant physiology*, 127(4), 1750-1763. doi: 10.1104/pp.010334
- Angelino, D., Dosz, E. B., Sun, J., Hoeflinger, J. L., Van Tassell, M. L., Chen, P., ... & Jeffery, E. H. (october, 2015). Myrosinase-dependent and-independent formation and control of isothiocyanate products of glucosinolate hydrolysis. *Frontiers in plant science*, 6, 831. doi:10.3389/fpls.2015.00831
- Anuradha, R., Suresh, A. K., & Venkatesh, K. V. (june, 1999). Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. *Process Biochemistry*, 35(3-4), 367-375. doi:10.1016/s0032-9592(99)00080-1

Association of Official Analytical Chemists. (1990). Official methods of analysis. (15 ed.) Washington, United States of America.

Association of Official Analytical Chemists. (1995). Official methods of analysis (16 ed.) Washington, United States of America.

Arbizu, C., & Tapia, M. (1994). Neglected crops, p 149-163. In: J.E. Hernándo Bernejo and J. León (eds.). Plant Production and Protection Series No.26.FOA, Rome, Italy. Recuperado en: <https://hort.purdue.edu/newcrop/1492/tubers.html>

Arora, R., Vig, A. P., & Arora, S. (january, 2014). Glucosinolates : transposing trends of identification methods from paper chromatography to microchip analysis. Int J Life Sci Biotech & Pharma Res, 3, 42-61. Recuperado en : <https://n9.cl/v5h0w>

Awasthi, S., & Saraswathi, N. T. (november, 2016). Sinigrin, a major glucosinolate from cruciferous vegetables restrains non-enzymatic glycation of albumin. International journal of biological macromolecules, 83, 410-415. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.11.01

Badenes-Pérez, F.R., Gershenzon, J., Heckel, D.G. (july, 2019). Plant glucosinolate content increases susceptibility to diamondback moth (*Lepidoptera: Plutellidae*) regardless of its diet. Journal of Pest Science, 93(1): 491-506. doi:10.1007/s10340-019-01139-z

Baenas, N., Cartea, M. E., Moreno, D. A., Tortosa, M., & Francisco, M. (2020). Processing and cooking effects on glucosinolates and their derivatives. En Charis Galanakis (Eds.), Glucosinolates: Properties, Recovery, and Applications (pp. 181–212). Greece, ISBN. doi:10.1016/b978-0-12-816493-8.00006-8

Bak, S., & Feyereisen, R. (september, 2001). The involvement of two P450 enzymes, CYP83B1 and CYP83A1, in auxin homeostasis and glucosinolate biosynthesis. Plant Physiology, 127(1), 108-118. doi: 10.1104/pp.127.1.108

- Banerjee, A., Variyar, P. S., Chatterjee, S., & Sharma, A. (novembre, 2014). Effect of post-harvest radiation processing and storage on the volatile oil composition and glucosinolate profile of cabbage. *Food chemistry*, 151, 22-30. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.055
- Barba, F. J., Nikmaram, N., Roohinejad, S., Khelfa, A., Zhu, Z., & Koubaa, M. (august, 2016). Bioavailability of glucosinolates and their breakdown products: Impact of processing. *Frontiers in nutrition*, 3, 24. doi: 10.3389/fnut.2016.00024
- Barillari, J., Gueyrard, D., Rollin, P., & Iori, R. (may, 2007). Barbarea verna as a source of 2-phenylethyl glucosinolate, precursor of cancer chemopreventive phenylethyl isothiocyanate. *Fitoterapia*, 72(7), 760-764. doi:10.1016/s0367-326x(01)00320-3
- Begovic, J., Fira, D., Terzic-Vidojevic, A., & Topisirovic, L. (december, 2010). Influence of carbohydrates on cell properties of *Lactobacillus rhamnosus*. *Central European Journal of Biology*, 5(1), 103-110. doi:10.2478/s11535-009-0078-1
- Bell, L., Oruna-Concha, M. J., & Wagstaff, C. (september, 2015). Identification and quantification of glucosinolate and flavonol compounds in rocket salad (*Eruca sativa*, *Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*) by LC-MS: Highlighting the potential for improving nutritional value of rocket crops. *Food Chemistry*, 172, 852-861. doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.1
- Bhat, R., & Vyas, D. (december, 2019). Myrosinase: insights on structural, catalytic, regulatory, and environmental interactions. *Critical reviews in biotechnology*, 39(4), 508-523. doi:10.1080/07388551.2019.1576024
- Blažević, I., Montaut, S., Burčul, F., Olsen, C. E., Burow, M., Rollin, P., & Agerbirk, N. (august, 2020). Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants. *Phytochemistry*, 169, 112100. doi:10.1016/j.phytochem.2019.1121

- Bones, A. M. (june, 1990). Distribution of  $\beta$ -Thioglucosidase Activity in Intact Plants, Cell and Tissue 6 Brassica napus L. *Journal of Experimental Botany*, 41(6), 737-744. doi: 10.1093/jxb/41.6.737
- Bones, A. M., & Rossiter, J. T. (may, 1996). The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum*, 97(1), 194-208. doi: 10.1111/j.1399-3054.1996.tb00497.x
- Bones, A. M., & Rossiter, J. T. (april, 2006). The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry*, 67(11), 1053-1067. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.02.024
- Bones, A., & Iversen, T. H. (may, 1985). Myrosin cells and myrosinase. *Israel Journal of Plant Sciences*, 34(2-4), 351-376. Recuperado en: <https://n9.cl/smajc>
- Brabban, A. D., & Edwards, C. (june, 1994). Isolation of glucosinolate degrading microorganisms and their potential for reducing the glucosinolate content of rapemeal. *FEMS microbiology letters*, 119(1-2), 83-88. doi: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb06871.x
- Broeckx, G., Kiekens, S., Jokicevic, K., Byl, E., Henkens, T., Vandenheuvél, D., ... & Kiekens, F. (august, 2019). Effects of initial cell concentration, growth phase, and process parameters on the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG after spray drying. *Drying Technology*, 38(11), 1474-1492. doi: 10.1080/07373937.2019.1648290
- Brown, K. K., & Hampton, M. B. (june, 2011). Biological targets of isothiocyanates. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810(9), 888-894. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.06.004
- Burmeister, W. P., Cottaz, S., Driguez, H., Iori, R., Palmieri, S., & Henrissat, B. (june, 1997). The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-

enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure*, 5(5), 663-676. doi: 10.1016/S0969-2126(97)00221-9

Burmeister, W. P., Cottaz, S., Rollin, P., Vasella, A., & Henrissat, B. (december, 2000). High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base. *Journal of Biological Chemistry*, 275(50), 39385-39393. doi: 10.1074/jbc.M006796200

Burow, M., Markert, J., Gershenzon, J., & Wittstock, U. (may, 2006). Comparative biochemical characterization of nitrile-forming proteins from plants and insects that alter myrosinase-catalysed hydrolysis of glucosinolates. *The FEBS journal*, 273(11), 2432-2446. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05252.x

Campos, D., Aguilar-Galvez, A., García-Ríos, D., Chirinos, R., Limaymanta, E., & Pedreschi, R. (march, 2019). Postharvest storage and cooking techniques affect the stability of glucosinolates and myrosinase activity of Andean mashua tubers (*Tropaeolum tuberosum*). *International Journal of Food Science & Technology*, 54(7), 2387-2395. doi: 10.1111/ijfs.14150

Canistro, D., Della Croce, C., Iori, R., Barillari, J., Bronzetti, G., Poi, G., ... & Paolini, M. (september, 2004). Genetic and metabolic effects of gluconasturtiin, a glucosinolate derived from cruciferae. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 545(1-2), 23-35. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2003.08.001

Cárdenas-Valencia, I., Nieto, J., Gasco, M., Gonzales, C., Rubio, J., Portella, J., & Gonzales, G. F. (november, 2008). *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) reduces testicular function: effect of different treatment times. *Andrologia*, 40(6), 352-357. Doi: 10.1111/j.1439-0272.2008.00868.x

Cebeci, F. (2017). The metabolism of plant glucosinolates by gut bacteria (Thesis doctoral, University of East Anglia). Recuperada de: <https://n9.cl/oonbf>

- Charron, C. S., & Sams, C. E. (october, 2004). Glucosinolate content and myrosinase activity in rapid-cycling *Brassica oleracea* grown in a controlled environment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(3), 321-330. Recuperado en: <https://journals.ashs.org/jashes/view/journals/jashes/129/3/article-p321.xml>
- Chen, Y., Yan, X., & Chen, S. (december, 2011). Bioinformatic analysis of molecular network of glucosinolate biosynthesis. *Computational biology and chemistry*, 35(1), 10-18. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2010.12.002
- Cheng, D. L., Hashimoto, K., & Uda, Y. (september, 2004). In vitro digestion of sinigrin and glucotropaeolin by single strains of *Bifidobacterium* and identification of the digestive products. *Food and chemical toxicology*, 42(3), 351-357. doi: 10.1016/j.fct.2003.09.008
- Chhajed, S., Mostafa, I., He, Y., Abou-Hashem, M., El-Domiaty, M., & Chen, S. (november, 2020). Glucosinolate Biosynthesis and the Glucosinolate–Myrosinase System in Plant Defense. *Agronomy*, 10(11), 1786. doi:10.3390/agronomy10111786
- Chirinos, R., Campos, D., Betalleluz, I., Giusti, M. M., Schwartz, S. J., Tian, Q., & Larondelle, Y. (august, 2006). High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection (HPLC– DAD) /HPLC– Mass Spectrometry (MS) Profiling of Anthocyanins from Andean Mashua Tubers (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz and Pavón) and Their Contribution to the Overall Antioxidant Activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(19), 7089-7097. doi: 10.1021/jf0614140
- Chirinos, R., Campos, D., Warnier, M., Pedreschi, R., Rees, J. F., & Larondelle, Y. (march, 2008). Antioxidant properties of mashua (*Tropaeolum tuberosum*) phenolic extracts against oxidative damage using biological in vitro assays. *Food chemistry*, 111(1), 98-105. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.03.038

- Choi, M. M., Shuang, S., Lai, H. Y., Cheng, S. C., Cheng, R. C., Cheung, B. K., & Lee, A. W. (may, 2004). Gas chromatography-mass spectrometric determination of total isothiocyanates in Chinese medicinal herbs. *Analytica Chimica Acta*, 516(1-2), 155-163. doi: 10.1016/j.aca.2004.04.010
- Chou, L. S., & Weimer, B. (may, 1999). Isolation and characterization of acid-and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82(1), 23-31. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75204-5
- Chu, D. F. (september, 2015). In silico evolution of diauxic growth. *BMC Evolutionary Biology*, 15(1), 1-17. doi:10.1186/s12862-015-0492-0
- Clarke, D. B. (february, 2010). Glucosinolates, structures and analysis in food. *Analytical Methods*, 2(4), 310-325. doi: 10.1039/B9AY00280D
- Cole, R. A. (march, 1976). Isothiocyanates, nitriles and thiocyanates as products of autolysis of glucosinolates in Cruciferae. *Phytochemistry*, 15(5), 759-762. doi: 10.1016/S0031-9422(00)94437-6
- Collazos, C., Alvisur, E., Vasquez, J., Herrera, N., Robles, N., Arias, M., & Roca, A. (1996). Tablas peruanas de composición de alimentos. Lima, Perú. Instituto Nacional de Salud.
- Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (march, 2004). Comparative survival of probiotic *lactobacilli* spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 1024-1039. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02219.x
- Córdova F, C. R. (2012). Evaluación del efecto del secado a dos temperaturas en el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas y capacidad antioxidante de la mashua morada (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) (Tesis de maestría). Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.

- Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., & Shinozaki, K. (november, 2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC plant biology*, 11(1), 1-14. doi: 10.1186/1471-2229-11-163
- Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., ... & Bartolomé, B. (may, 2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in microbiology*, 161(5), 372-382. doi: 10.1016/j.resmic.2010.04.006
- Curiel, J. A., Rodríguez, H., Landete, J. M., de las Rivas, B., & Muñoz, R. (october, 2010). Ability of *Lactobacillus brevis* strains to degrade food phenolic acids. *Food Chemistry*, 120(1), 225-229. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.10.012
- Daxenbichler, M. E., VanEtten, C. H., & Williams, P. H. (july, 1980). Glucosinolate products in commercial sauerkraut. *Journal of agricultural and food chemistry*, 28(4), 809-811. doi: 10.1021/jf60230a027
- De Nicola, G.R., Nyegue, M., Montaut, S., Iori, R., Menut, C., Tatibouët, A., Zollo, P. H.A. 2012. Profile and quantification of glucosinolates in *Pentadiplandra brazzeana* Baillon. *Phytochemistry*, 73: 51-56. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.09.006
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Limitone, A., Fox, P. F., & Gobbetti, M. (december, 2006). Response of *Lactobacillus helveticus* PR4 to heat stress during propagation in cheese whey with a gradient of decreasing temperatures. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 4503-4514. doi: 10.1128/AEM.01829-05
- Di Gioia, F., Pinela, J., de Haro Bailón, A., Fereira, I. C., & Petropoulos, S. A. (2020). The dilemma of “good” and “bad” glucosinolates and the potential to regulate their content. In Charis Galanakis (Eds.), *Glucosinolates: Properties, Recovery, and Applications* (pp. 1–45). Greece, ISBN. doi:10.1016/b978-0-12-816493-8.00001-9



- Douillard, F. P., & De Vos, W. M. (august, 2014). Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microbial cell factories*, 13(1), 1-21. doi:10.1186/1475-2859-13-s1-s8
- Duarte, A. (2015). Abiotic stress hormesis: hormetic stresses to maintain quality and enhance glucosinolates and phenolic compounds in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) during storage. (Thesis doctoral). Université Laval. Canada. Recuperada de: <https://corpus.ulaval.ca/jspui/bitstream/20.500.11794/26529/1/32086.pdf>
- Duque, A. S., De Almeida, A. M., Da Silva, A. B., Da Silva, J. M., Farinha, A. P., Santos, D., de Sousa Araújo, S. (2013). Abiotic stress responses in plants: the complexity of genes and networks to survive. In Kourosh Vahdati and Charles Leslie (Eds.), *Abiotic stress: plant responses and applications in agriculture* (pp. 49-101). doi: 10.5772/52779
- Esparza, E., Hadzich, A., & Cosio, E. (2015). La maca: la química detrás de su secado tradicional. *Revista de Química*, 29(1), 11-17. Recuperado en: <https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/12932>
- Espín, S; Brito, B; Villacrés, B; Rubio, A; Nieto, C; Grijalva, J (2001). Composición química, valor nutricional y usos potenciales de siete especies de raíces y tubérculos andinos. En Barrera, Tapia y Monteros (Eds). *Raíces y tubérculos andinos: alternativas para la conservación y uso sostenible en el ecuador.* (pp. 49-63). Recuperado en: [http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/06/RTAs\\_Ecuador\\_04.pdf](http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/06/RTAs_Ecuador_04.pdf)
- Even, S., Lindley, N. D., Loubière, P., & Cocaign-Bousquet, M. (august, 2002). Dynamic response of catabolic pathways to autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation to metabolic and energetic constraints. *Molecular microbiology*, 45(4), 1143-1152. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03086.x

- Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., & Talalay, P. (january, 2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56(1), 5-51. doi: 10.1016/S0031-9422(00)00316-2
- Ferguson, I., Volz, R., Woolf, A. (august, 1999). Preharvest factors affecting physiological disorders of fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 15(3): 255-262. doi: 10.1016/s0925-5214(98)00089-1
- Fernandez, A., Ogawa, J., Penaud, S., Boudebbouze, S., Ehrlich, D., van de Guchte, M., & Maguin, E. (july, 2008). Rerouting of pyruvate metabolism during acid adaptation in *Lactobacillus bulgaricus*. *Proteomics*, 8(15), 3154-3163. doi: 10.1002/pmic.200700974
- Finiguerra, M. G., Iori, R., & Palmieri, S. (january, 2001). Soluble and total myrosinase activity in defatted *Crambe abyssinica* meal. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(2), 840-845. doi: 10.1021/jf000917h
- Flores, H. E., Walker, T. S., Guimarães, R. L., Bais, H. P., & Vivanco, J. M. (abril, 2003). Andean root and tuber crops: Underground rainbows. *HortScience*, 38(2), 161-167. doi: 10.21273/hortsci.38.2.161
- Foo, H. L., Grønning, L. M., Goodenough, L., Bones, A. M., Danielsen, B. E., Whiting, D. A., & Rossiter, J. T. (February, 2000). Purification and characterisation of epithiospecifier protein from *Brassica napus*: enzymic intramolecular sulphur addition within alkenyl thiohydroximates derived from alkenyl glucosinolate hydrolysis. *FEBS letters*, 468(2-3), 243-246. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01176-5
- Frioni, L. (2006). *Microbiología: básica, ambiental y agrícola*. Montevideo, Uruguay, Facultad de Agronomía de la República Oriental de Uruguay. Recuperado en: [http://microbiologa\\_bsica\\_ambiental\\_y\\_agricola\\_lilian\\_friomi\\_2006.pdf](http://microbiologa_bsica_ambiental_y_agricola_lilian_friomi_2006.pdf)

- Fujioka, N., Fritz, V., Upadhyaya, P., Kassie, F., & Hecht, S. S. (february, 2016). Research on cruciferous vegetables, indole-3-carbinol, and cancer prevention: A tribute to Lee W. Wattenberg. *Molecular nutrition & food research*, 60(6), 1228-1238. doi: 10.1002/mnfr.201500889
- Gaspar, P., Carvalho, A. L., Vinga, S., Santos, H., & Neves, A. R. (april, 2013). From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnology advances*, 31(6), 764-788. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.03.011
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J. F., & Dommes, J. (july, 2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant growth regulation*, 37(3), 263-285. doi:10.1023/a:1020835304842
- Ghosh, S, RingØ E, Selvam, A, D, G, Rahiman K, M, Sathyan N, John N, Hatha A, A, M (january, 2014) Gut associated lactic acid bacteria isolated from the estuarine fish *Mugil cephalus*: molecular diversity and antibacterial activities against pathogens. *Int J Aquac* 4:1–11. doi: 10.5376/ija.2014.04.0001
- Gibbs, P. E., Marshall, D., & Brunton, D. (1978). Studies on the cytology of *Oxalis tuberosa* and *Tropaeolum tuberosum*. Notes. Recuperado en: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302100771>
- Gonzales, P., Kofer, W., Huarancca, T., Vivanco, F., Arbizu, C., & Cosio, E. (2009). Crop protection by volatile organic compounds from mashua: what we can learn from ancient agricultural techniques. In *Tropical roots and tubers in a changing climate. A critical opportunity for the world conference*. Lima, Perú. Recuperado en: [https://www.researchgate.net/publication/264508215\\_Crop\\_protection\\_by\\_volatiles\\_organic\\_compounds\\_from\\_mashua\\_what\\_we\\_can\\_learn\\_from\\_ancient\\_agricultural\\_techniques](https://www.researchgate.net/publication/264508215_Crop_protection_by_volatiles_organic_compounds_from_mashua_what_we_can_learn_from_ancient_agricultural_techniques)
- Gonzales, P., Kofer, W., Huarancca, T., Vivanco, F., Arbizu, C., & Cosio, E. (2009). Crop protection by volatile organic compounds from mashua: what we can learn from

ancient agricultural techniques. In *Tropical roots and tubers in a changing climate. A critical opportunity for the world conference. Lima, Perú, International potato centre (CIP), International Society for Tropical Root crops (ISTRIC) and UNALM.*  
Recuperado en:  
<https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/88124/CIP%20Annual%20Report%202009.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Grau, A., Ortega, R. D., Nieto, C. C., & Hermann, M. (2003). Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav.). Recuperado en:  
[https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/\\_migrated/uploads/tx\\_news/Mashua\\_\\_Tropaeolum\\_tuberosum\\_Ru%c3%adz\\_\\_amp\\_\\_Pav.\\_880.pdf](https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Mashua__Tropaeolum_tuberosum_Ru%c3%adz__amp__Pav._880.pdf)

Gross, R., Koch, F., Malaga, I., De Miranda, A. F., Schoeneberger, H., & Trugo, L. C. (october, 1989). Chemical composition and protein quality of some local Andean food sources. *Food Chemistry*, 34(1), 25-34. doi: 10.1016/0308-8146(89)90030-7

Grubb, C. D., & Abel, S. (february, 2006). Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in plant science*, 11(2), 89-100. doi: 10.1016/j.tplants.2005.12.006

Gupta, M., & Bajaj, B. K. (july, 2018). Functional characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from kalarei and development of probiotic fermented oat flour. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(4), 654-661. doi:10.1007/s12602-017-9306-6

Gutiérrez, R. M. P., & Perez, R. L. (setptember, 2004). *Raphanus sativus* (Radish): their chemistry and biology. *The Scientific World Journal*, 4, 811-837. doi 10.1100/tsw.2004.131

Halkier, B. A., & Gershenzon, J. (january, 2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 303-333. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228

- Han, N., Ku, K. M., & Kim, J. (april, 2019). Postharvest variation of major glucosinolate and their hydrolytic products in Brassicoraphanus 'BB1'. *Postharvest Biology and Technology*, 154, 70-78. doi: 10.1016/j.postharvbio.2019.04.011
- Hanlon, P. R., & Barnes, D. M. (january, 2011). Phytochemical composition and biological activity of 8 varieties of radish (*Raphanus sativus* L.) sprouts and mature taproots. *Journal of Food Science*, 76(1), C185-C192. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01972.x
- Hanschen, F. S., & Schreiner, M. (june, 2017). Isothiocyanates, nitriles, and epithionitriles from glucosinolates are affected by genotype and developmental stage in *Brassica oleracea* varieties. *Frontiers in plant science*, 8, 1095. doi: 10.3389/fpls.2017.01095
- Hanschen, F. S., Klopsch, R., Oliviero, T., Schreiner, M., Verkerk, R., & Dekker, M. (January, 2017). Optimizing isothiocyanate formation during enzymatic glucosinolate breakdown by adjusting pH value, temperature and dilution in *Brassica* vegetables and *Arabidopsis thaliana*. *Scientific reports*, 7, 40807. Recuperado en: <https://www.nature.com/articles/srep40807>
- Hanschen, F. S., Yim, B., Winkelmann, T., Smalla, K., & Schreiner, M. (july, 2015). Degradation of biofumigant isothiocyanates and allyl glucosinolate in soil and their effects on the microbial community composition. *PLoS One*, 10(7), e0132931. doi: 10.1371/journal.pone.0132931
- Hansen, C. H., Du, L., Naur, P., Olsen, C. E., Axelsen, K. B., Hick, A. J., ... & Halkier, B. A. (january, 2001). CYP83B1 is the oxime-metabolizing enzyme in the glucosinolate pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 24790-24796. doi: 10.1074/jbc.M102637200
- Hara, M., Eto, H., & Kuboi, T. (february, 2001). Tissue printing for myrosinase activity in roots of turnip and Japanese radish and horseradish: a technique for localizing

myrosinases. *Plant Science*, 160(3), 425-431. doi: 10.1016/S0168-9452(00)00400-3

Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J. P., & Davies, G. (july, 1995). Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(15), 7090-7094. doi: 10.1073/pnas.92.15.7090

Hermesen, R., Okano, H., You, C., Werner, N., & Hwa, T. (april, 2015). A growth-rate composition formula for the growth of *E. coli* on co-utilized carbon substrates. *Molecular systems biology*, 11(4), 801. doi: doi.org/10.15252/msb.20145537

Hernández, J.E., & León, J. (1994). Neglected crops: 1492 from a different perspective. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Recuperado en: <https://www.fao.org/3/t0646e/t0646e.pdf>

Hofvendahl, K., & Hahn-Hägerdal, B. (february, 2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. *Enzyme and microbial technology*, 26(2-4), 87-107. doi: 10.1016/S0141-0229(99)00155-6

Hughenoltz, J. (december, 2008). The lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production. *International Dairy Journal*, 18(5), 466-475. doi: 10.1016/j.idairyj.2007.11.015

Hughenoltz, J., Sybesma, W., Groot, M. N., Wisselink, W., Ladero, V., Burgess, K. & Savoy, G. (2002). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. In Siezen R.J., Kok J., Abee T., Schasfsma G. (eds). *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (pp. 217-235). Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-017-2029-8\_13

Hyun LB, You HJ, Park MS, Kwon B, Ji GE (march, 2006) Transformation of the glycosides from food materials by probiotics and food microorganisms. *J Microbiol*

Biotechnol 16(4):497–504. Recuperado en:  
<https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200622219607474.pdf>

Instituto Nacional de Estadística e Informática (2020). Informe técnico: producción nacional. Recuperado en: <http://m.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/boletines/12-informe-tecnico-produccion-nacional-oct-2020.pdf>

International Agency for Research on Cancer, IARC (2004). Working Group on the Evaluation of Cancer-Preventive Strategies, & World Health Organization. Cruciferous vegetables, isothiocyanates and índoles (No. 9). Recuperado en: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Handbooks-Of-Cancer-Prevention/Cruciferous-Vegetables-Isothiocyanates-And-Indoles-2004>

Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., & Morimitsu, Y. (february, 2014). Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breeding science*, 64(1), 48-59. doi: 10.1270/jsbbs.64.48

Ishida, M., Nagata, M., Ohara, T., Kakizaki, T., Hatakeyama, K., & Nishio, T. (january, 2012). Small variation of glucosinolate composition in Japanese cultivars of radish (*Raphanus sativus* L.) requires simple quantitative analysis for breeding of glucosinolate component. *Breeding science*, 62(1), 63-70. doi: 10.1270/jsbbs.62.63

James, DC, & Rossiter, JT. (june, 1991). Desarrollo y características de la mirosinasa en *Brassica napus* durante el crecimiento temprano de las plántulas. *Physiologia Plantarum*, 82 (2), 163-170. doi: 10.1111/j.1399-3054.1991.tb00076.x

Johns, T., Kitts, W. D., Newsome, F., & Towers, G. N. (march, 1982). Anti-reproductive and other medicinal effects of *Tropaeolum tuberosum*. *Journal of ethnopharmacology*, 5(2), 149-161. doi: 10.1016/0378-8741(82)90040-X

Johnson, I. T. (july, 2004). New approaches to the role of diet in the prevention of cancers of the alimentary tract. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 551(1-2), 9-28. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.02.017

- Johnson, I. T. (may, 2007). Phytochemicals and cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66(2), 207-215. doi: 10.1017/S0029665107005459
- Jones, A. M. E., Bridges, M., Bones, A. M., Cole, R., & Rossiter, J. T. (january, 2001). Purification and characterisation of a non-plant myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (L.). *Insect biochemistry and molecular biology*, 31(1), 1-5. doi: 10.1016/S0965-1748(00)00157-0
- Jones, A. M. E., Winge, P., Bones, A. M., Cole, R., & Rossiter, J. T. (march, 2002). Characterization and evolution of a myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(3), 275-284. doi: 10.1016/S0965-1748(01)00088-1
- Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., & Pesseat, S. (may, 2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236-1240. doi: 10.1093/bioinformatics/btu031
- Kala, C, Ali, SS, Ahmad, N., Jamal Gilani, S. y Ali Khan, N. (march, 2018). Isothiocyanates: a review. *Research Journal of Pharmacognosy*, 5(2), 71-89. doi: 10.22127/RJP.2018.58511
- Kapusta-Duch, J., Kusznierevich, B., Leszczyńska, T., & Borczak, B. (may, 2016). Effect of cooking on the contents of glucosinolates and their degradation products in selected Brassica vegetables. *Journal of Functional Foods*, 23, 412-422. doi: 10.1016/j.jff.2016.03.006
- Kim, M. R., Lee, K. J., & Kim, H. Y. (february, 1997). Effect of processing on the content of sulforaphane of broccoli. *Korean J Soc Food Sci*, 13(4), 422-426. doi: 10.7318/KJFC/2013.28.1.057
- King, S. R., & Gershoff, S. N. (october, 1987). Nutritional evaluation of three underexploited Andean tubers: *Oxalis tuberosa* (Oxalidaceae), *Ullucus tuberosus* (Basellaceae), and *Tropaeolum tuberosum* (Tropaeolaceae). *Economic Botany*,



41(4), 503-511. Recuperado en:  
<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02908144>

Kissen, R., & Bones, A. M. (may, 2009). Nitrile-specifier proteins involved in glucosinolate hydrolysis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(18), 12057-12070. doi: 10.1074/jbc.M807500200

Kissen, R., Eberl, F., Winge, P., Uleberg, E., Martinussen, I., & Bones, A. M. (october, 2016). Effect of growth temperature on glucosinolate profiles in *Arabidopsis thaliana* accessions. *Phytochemistry*, 130, 106-118. doi: 10.1016/j.phytochem.2016.06.003

Kissen, R., Rossiter, J. T., & Bones, A. M. (november, 2008). The 'mustard oil bomb': not so easy to assemble? Localization, expression and distribution of the components of the myrosinase enzyme system. *Phytochemistry reviews*, 8(1), 69-86. doi:10.1007/s11101-008-9109-1

Knight, H., & Knight, M. R. (june, 2001). Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in plant science*, 6(6), 262-267. Doi: 10.1016/S1360-1385(01)01946-X

Kocková, M. J. M. A., & Valík, E. Š. Ľ. (february, 2013). Cereals and pseudocereals as substrates for growth and metabolism of a probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Food and Nutrition Research*, 52(1), 25-36. Recuperado en: [https://www.researchgate.net/publication/260855443\\_Cereals\\_and\\_pseudocereals\\_as\\_substrates\\_for\\_growth\\_and\\_metabolism\\_of\\_a\\_probiotic\\_strain\\_Lactobacillus\\_rhamnosus\\_GG](https://www.researchgate.net/publication/260855443_Cereals_and_pseudocereals_as_substrates_for_growth_and_metabolism_of_a_probiotic_strain_Lactobacillus_rhamnosus_GG)

Kołodziejcki, D., Piekarska, A., Hanschen, F. S., Pilipczuk, T., Tietz, F., Kusznierevicz, B., & Bartoszek, A. (october, 2019). Relationship between conversion rate of glucosinolates to isothiocyanates/indoles and genotoxicity of individual parts of Brassica vegetables. *European Food Research and Technology*, 245(2), 383-400. doi: doi:10.1007/s00217-018-3170-9

- Konings, W. N., Lolkema, J. S., Bolhuis, H., Van Veen, H. W., Poolman, B., & Driessen, A. J. M. (february, 1997). The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria, energy transduction and multidrug resistance. *Antonie van leeuwenhoek*, 71(1), 117-128. doi: doi:10.1023/a:1000143525601
- Koponen, J., Laakso, K., Koskenniemi, K., Kankainen, M., Savijoki, K., Nyman, T. A., ... & Varmanen, P. (february, 2012). Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of proteomics*, 75(4), 1357-1374. doi: 10.1016/j.jprot.2011.11.009
- Korus, A., Słupski, J., Gębczyński, P., & Banaś, A. (june, 2014). Effect of preliminary processing and method of preservation on the content of glucosinolates in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) leaves. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 1003-1008. doi: 10.1016/j.lwt.2014.06.030
- Ku, K. M., Jeffery, E. H., Juvik, J. A. (September, 2013). Influence of seasonal variation and methyl jasmonate mediated induction of glucosinolate biosynthesis on quinone reductase activity in broccoli florets. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(40): 9623-9631. doi: 10.1021/jf4027734
- Ku, S. K., & Bae, J. S. (april, 2014). Antithrombotic activities of sulforaphane via inhibiting platelet aggregation and FIIa/FXa. *Archives of pharmacal research*, 37(11), 1454-1463. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.04.048
- Kuchernig, J. C., Burow, M., & Wittstock, U. (July, 2012). Evolution of specifier proteins in glucosinolate-containing plants. *BMC evolutionary biology*, 12(1), 127. doi:10.1186/1471-2148-12-127
- Lai, R. H., Miller, M. J., & Jeffery, E. (october, 2010). Glucoraphanin hydrolysis by microbiota in the rat cecum results in sulforaphane absorption. *Food & function*, 1(2), 161-166. doi: 10.1039/C0FO00110D

- Lai, R. H., Miller, M. J., & Jeffery, E. H. (april, 2009). Glucoraphanin is hydrolyzed by *lactobacilli* in vitro and rat cecal microbiota in vitro and in situ. *FASEB J*, 23, Supplement 561.4. doi: 10.1096/fasebj.23.1\_supplement.561.4
- Lambrix, V., Reichelt, M., Mitchell-Olds, T., Kliebenstein, D. J., & Gershenzon, J. (december, 2001). The Arabidopsis epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *The Plant Cell*, 13(12), 2793-2807. doi: 10.1105/tpc.010261
- Larkin, R. P., & Griffin, T. S. (july, 2007). Control of soilborne potato diseases using Brassica green manures. *Crop protection*, 26(7), 1067-1077. doi: 10.1016/j.cropro.2006.10.004
- Lee, B. H., Choi, W. S., Lee, S. E., & Park, B. S. (April, 2001). Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Crop protection*, 20(4), 317-320. doi: 10.1016/S0261-2194(00)00158-7
- Lee, J. G., Lim, S., Kim, J., & Lee, E. J. (october, 2017). The mechanism of deterioration of the glucosinolate-myrosinase system in radish roots during cold storage after harvest. *Food chemistry*, 233, 60-68 doi: 10.1016/j.foodchem.2017.04.104
- Lee, K., Lee, H. G., Pi, K., & Choi, Y. J. (april, 2008). The effect of low pH on protein expression by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. *Proteomics*, 8(8), 1624-1630. doi: 10.1002/pmic.200700663
- Leidi, E. O., Altamirano, A. M., Mercado, G., Rodriguez, J. P., Ramos, A., Alandia, G & Jacobsen, S. E. (december, 2018). Andean roots and tubers crop as sources of functional foods. *Journal of functional foods*, 51, 86-93. doi: 10.1016/j.jff.2018.10.007

- Li, F., Hullar, M. A., Beresford, S. A., & Lampe, J. W. (february, 2011). Variation of glucoraphanin metabolism in vivo and ex vivo by human gut bacteria. *British journal of nutrition*, 106(3), 408-416. doi:10.1017/s0007114511000274
- Li, R., Song, D., Vriesekoop, F., Cheng, L., Yuan, Q., & Liang, H. (september, 2016). Glucoraphenin, sulforaphene, and antiproliferative capacity of radish sprouts in germinating and thermal processes. *European Food Research and Technology*, 243(4), 547-554. doi:10.1007/s00217-016-2764-3
- Li, X., & Kushad, M. M. (october, 2004). Correlation of glucosinolate content to myrosinase activity in horseradish (*Armoracia rusticana*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(23), 6950-6955. doi: 10.1021/jf0401827
- Li, Y., Karagöz, G. E., Seo, Y. H., Zhang, T., Jiang, Y., Yu, Y., ... & Sun, D. (december, 2012). Sulforaphane inhibits pancreatic cancer through disrupting Hsp90–p50Cdc37 complex and direct interactions with amino acids residues of Hsp90. *The Journal of nutritional biochemistry*, 23(12), 1617-1626. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.11.004
- Li, Y., Zhang, T., Korkaya, H., Liu, S., Lee, H. F., Newman, B., ... & Sun, D. (may, 2010). Sulforaphane, a dietary component of broccoli/broccoli sprouts, inhibits breast cancer stem cells. *Clinical Cancer Research*, 16(9), 2580-2590. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2937
- Lim, S., Lee, E. J., & Kim, J. (february, 2015). Decreased sulforaphene concentration and reduced myrosinase activity of radish (*Raphanus sativus* L.) root during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 100, 219-225. doi: 10.1016/j.postharvbio.2014.10.007
- Lim, T. K. (February, 2016). *Tropaeolum tuberosum*. In *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants* (pp. 94-102). Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-319-26065-5\_3

- Limaymanta, E. (2018). Efecto del estrés abiótico post-cosecha en la síntesis de glucosinolatos, actividad mirosinasa y carotenoides en mashua (*Tropaeolum tuberosum*). (Tesis ingeniero). Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
- Liu, T. T., & Yang, T. S. (july, 2010). Stability and antimicrobial activity of allyl isothiocyanate during long-term storage in an oil-in-water emulsion. *Journal of food science*, 75(5), C445-C451. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01645.x
- Luang-In, V. (2013). Influence of human gut microbiota on the metabolic fate of glucosinolatos (Tesis doctor, Imperial college London). Recuperado en: <https://spiral.imperial.ac.uk/my.policy>
- Luang-In, V., Albaser, A. A., Nueno-Palop, C., Bennett, M. H., Narbad, A., & Rossiter, J. T. (june, 2016). Glucosinolate and desulfo-glucosinolate metabolism by a selection of human gut bacteria. *Current microbiology*, 73(3), 442-451. doi:10.1007/s00284-016-1079-8
- Luang-In, V., Narbad, A., Cebeci, F., Bennett, M., & Rossiter, J. T. (march, 2015). Identification of proteins possibly involved in glucosinolate metabolism in *L. agilis* R16 and *E. coli* VL8. *The protein journal*, 34(2), 135-146. doi:10.1007/s10930-015-9607-0
- Luang-In, V., Narbad, A., Nueno-Palop, C., Mithen, R., Bennett, M., & Rossiter, J. T. (october, 2014). The metabolism of methylsulfinylalkyl-and methylthioalkyl-glucosinolates by a selection of human gut bacteria. *Molecular nutrition & food research*, 58(4), 875-883. doi: 10.1002/mnfr.201300377
- Luciano, F. B., & Holley, R. A. (may, 2011). Bacterial degradation of glucosinolates and its influence on the growth of *E. coli* O157: H7. *Fleischwirtsch. Int*, 1, 78-81. Recuperado en: [https://www.researchgate.net/profile/Fernando-Luciano/publication/281228115\\_Bacterial\\_degradation\\_of\\_glucosinolates\\_and\\_its\\_influence\\_on\\_growth\\_of\\_E\\_coli\\_O157H7\\_in\\_a\\_dry-fermented\\_sausage\\_model\\_-\\_part\\_2/links/55dda60108ae3ab722b24424/Bacterial-](https://www.researchgate.net/profile/Fernando-Luciano/publication/281228115_Bacterial_degradation_of_glucosinolates_and_its_influence_on_growth_of_E_coli_O157H7_in_a_dry-fermented_sausage_model_-_part_2/links/55dda60108ae3ab722b24424/Bacterial-)

degradation-of-glucosinolates-and-its-influence-on-growth-of-E-coli-O157H7-in-a-dry-fermented-sausage-model-part-2.pdf

Luciano, F. B., Belland, J., & Holley, R. A. (january, 2011). Microbial and chemical origins of the bactericidal activity of thermally treated yellow mustard powder toward *Escherichia coli* O157: H7 during dry sausage ripening. International journal of food microbiology, 145(1), 69-76. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.028

Manici, L. M., Lazzeri, L., & Palmieri, S. (july, 1997). In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(7), 2768-2773. doi: 10.1021/jf9608635

Manrique, I., Arbizu, C., Vivanco, F., Gonzales, R., Ramírez, C., Chávez, O., ... & Ellis, D. (2013). *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. colección de germoplasma de mashua conservada en el Centro Internacional de la Papa (CIP). doi: 10.4160/9789290604310

Marceau, A., Zagorec, M., & Champomier-Vergès, M. (may, 2002). Analysis of *Lactobacillus sakei* adaptation to its environment by a proteomic approach. Sciences des Aliments (France). doi: 10.1128/AEM.02451-09

Martín, J. C., & Higuera, B. L. (february, 2016). Glucosinolate composition of Colombian accessions of mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón), structural elucidation of the predominant glucosinolate and assessment of its antifungal activity. Journal of the Science of Food and Agriculture, 96(14): 4702-4712. doi: 10.1002/jsfa.7689

Martínez-Ballesta, M., Moreno, D. A., Carvajal, M. (may, 2013). The physiological importance of glucosinolates on plant response to abiotic stress in Brassica. International journal of molecular sciences, 14(6): 11607-11625. Doi: 10.3390/ijms140611607

- Matusheski, N. V., Swarup, R., Juvik, J. A., Mithen, R., Bennett, M., & Jeffery, E. H. (February, 2006). Epithiospecifier protein from broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *italica*) inhibits formation of the anticancer agent sulforaphane. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(6), 2069-2076. doi: 10.1021/jf0525277
- Matusheski, N. V., Wallig, M. A., Juvik, J. A., Klein, B. P., Kushad, M. M., & Jeffery, E. H. (march, 2001). Preparative HPLC method for the purification of sulforaphane and sulforaphane nitrile from *Brassica oleracea*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(4), 1867-1872. doi: 10.1021/jf0013860
- Mays, J. R., Weller Roska, R. L., Sarfaraz, S., Mukhtar, H., & Rajski, S. R. (march, 2008). Identification, Synthesis, and Enzymology of Non-natural Glucosinolate Chemopreventive Candidates. *ChemBioChem*, 9(5), 729-747. doi: 10.1002/cbic.200700586
- Mazumder, A., Dwivedi, A., & Du Plessis, J. (march, 2016). Sinigrin and its therapeutic benefits. *Molecules*, 21(4), 416. doi: 10.3390/molecules21040416
- McConnell M, A, Tannock G, W (1991) *Lactobacilli* and azoreductase activity in the murine cecum. *Appl Environ Microbiol* 57(12):3664–3665. Doi: 10.1128/aem.57.12.3664-3665.1991
- Medina, M, L. A. (2020). Evaluación del efecto del procesamiento por calor sobre el contenido de Glucosinolatos de Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) deshidratada por liofilización. (Tesis doctoral) Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Perú.
- Mejía, G. (2016). Agrobiodiversidad para alimentar al Perú y al mundo: Experiencias exitosas de conservación de la ABD en comunidades andinas de Huánuco y Lima. Lima, Perú., Instituto de Desarrollo y Medio Ambiente (IDMA), Welthungerhilfe, Unión Europea.

- Mikkelsen, M. D., Petersen, B. L., Olsen, C. E., & Halkier, B. A. (april, 2002). Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates. *Amino acids*, 22(3), 279-295. doi: 10.1007/s007260200014
- Ministerio de Agricultura y Riego. (2018). Anuario estadístico: Producción anual. Recuperado en: [https://siea.midagri.gob.pe/portal/phocadownload/datos\\_y\\_estadisticas/anuarios/agricola/agricola\\_2018.pdf](https://siea.midagri.gob.pe/portal/phocadownload/datos_y_estadisticas/anuarios/agricola/agricola_2018.pdf)
- Mithen, R. (2001). Glucosinolates—biochemistry, genetics and biological activity. *Plant Growth Regulation*, 34(1), 91-103. doi: 10.1023/A:1013330819778
- Molina-Vargas, L. F. (march, 2013). Mechanism of action of isothiocyanates. A review. *Agronomía Colombiana*, 31(1), 68-75. Recuperado en: <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v31n1/v31n1a08.pdf>
- Morant, A. V., Jørgensen, K., Jørgensen, C., Paquette, S. M., Sánchez-Pérez, R., Møller, B. L., & Bak, S. (may, 2008).  $\beta$ -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry*, 69(9), 1795-1813. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.03.006
- Mozzi, F., Raya, R. R., Vignolo, G. M., & Love, J. C. (2016). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria—Novel Applications 2e*. Recuperado en: <https://www.wiley.com/en-ae/Biotechnology+of+Lactic+Acid+Bacteria%3A+Novel+Applications%2C+2nd+Edition-p-9781118868409>
- Mullaney, J. A. (2013). *The biotransformation of glucosinolates: a bacterial perspective*. (Thesis doctoral, Massey University), Manawatū, New Zealand. Recuperado en: [https://mro.massey.ac.nz/bitstream/handle/10179/4935/02\\_whole.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://mro.massey.ac.nz/bitstream/handle/10179/4935/02_whole.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
- Mullaney, J. A., Kelly, W. J., McGhie, T. K., Ansell, J., & Heyes, J. A. (march, 2013). Lactic acid bacteria convert glucosinolates to nitriles efficiently yet differently from



*Enterobacteriaceae*. Journal of agricultural and food chemistry, 61(12), 3039-3046.  
doi: 10.1021/jf305442j

Mutlib, A. E., Dickenson, P., Chen, S. Y., Espina, R. J., Daniels, J. S., & Gan, L. S. (august, 2002). Bioactivation of benzylamine to reactive intermediates in rodents: formation of glutathione, glutamate, and peptide conjugates. Chemical research in toxicology, 15(9), 1190-1207. doi: 10.1021/tx020063q

Naidu, A. S., Bidlack, W. R., & Clemens, R. A. (jun, 1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Critical reviews in food science and nutrition, 39(1), 13-126.  
doi: 10.1080/10408699991279187

Najjaa, H., Arfa, A. B., Máthé, Á., Neffati, M. (september, 2017). Aromatic and medicinal plants of Tunisian arid and desert zone used in traditional medicine, for drug discovery and biotechnological applications. In Medicinal and Aromatic Plants of the World-Africa Volume 3 (pp. 157-230). doi:10.1007/978-94-024-1120-1\_8

Narbad, A., & Rossiter, J. T. (may, 2018). Gut glucosinolate metabolism and isothiocyanate production. Molecular nutrition & food research, 62(18), 1700991.  
doi: 10.1002/mnfr.201700991

National Research Council. (1989). Lost crops of the Incas: little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. National Academies Press  
Recuperado en: <https://www.nap.edu/catalog/1398/lost-crops-of-the-incas-little-known-plants-of-the>

Noratto, G., Cisneros-Zevallos, L., & Mo, H. B. (2004). Tropaeolum tuberosum (mashua) extracts suppress tumor cell proliferation. In Faseb Journal (Vol. 18, No. 5, pp. A886-A886). 9650 Rockville pike, Bethesda, MD 20814-3998 USA: Federation American Soc Exp Biol.

Nugon-Baudon, L., Rabot, S., Wal, J. M., & Szylit, O. (january, 1990). Interactions of the intestinal microflora with glucosinolates in rapeseed meal toxicity: First evidence

of an intestinal *Lactobacillus* possessing a myrosinase-like activity in vivo. Journal of the Science of Food and Agriculture, 52(4), 547-559. doi: 10.1002/jsfa.2740520412

Nugrahedhi, P. Y., Widianarko, B., Dekker, M., Verkerk, R., Oliviero, T. (October, 2014). Retention of glucosinolates during fermentation of *Brassica juncea*: a case study on production of sayur asin. European Food Research and Technology, 240(3): 559-565. doi: 10.1007/s00217-014-2355-0

Oginsky, E. L., Stein, A. E., & Greer, M. A. (June, 1965). Myrosinase Activity in Bacteria as Demonstrated by the Conversion of Progoitrin to Goitrin. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 119(2), 360-364. doi: 10.3181/00379727-119-30181

Ohtsuru, M., & Hata, T. (November, 1973). General characteristics of the intracellular myrosinase from *Aspergillus niger*. Agricultural and Biological Chemistry, 37(11), 2543-2548. doi: 10.1080/00021369.1973.10861037

Okunade, O. A., Ghawi, S. K., Methven, L., & Niranjana, K. (April, 2015). Thermal and pressure stability of myrosinase enzymes from black mustard (*Brassica nigra* LWDJ Koch. var. *nigra*), brown mustard (*Brassica juncea* L. Czern. var. *juncea*) and yellow mustard (*Sinapsis alba* L. subsp. *maire*) seeds. Food Chemistry, 187, 485-490. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.04.054

Olivier, C., Vaughn, S. F., Mizubuti, E. S., & Loria, R. (December, 1999). Variation in allyl isothiocyanate production within *Brassica* species and correlation with fungicidal activity. Journal of Chemical Ecology, 25(12), 2687-2701. doi: 10.1023/A:1020895306588

Ortega, O. R., Kliebenstein, D. J., Arbizu, C., Ortega, R., & Quiros, C. F. (September, 2006). Glucosinolate survey of cultivated and feral mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) in the Cuzco Region of Peru. Economic Botany, 60(3), 254-264. doi:10.1663/0013-0001(2006)60[254:gsocaf]2.0.co;2

- Osada, S., & Aoyagi, Y. (2014). Level of glucosinolates in Brassicaceae vegetables harvested during autumn and winter in Japan. *J Int Study Diet Habits*, 25(2), 121-130. doi: 10.2740/jisdh.25.121
- Pacheco, E. (2015). Caracterización morfológica y molecular de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) de los departamentos de Cusco y Cajamarca (Tesis de Magister Scientiae). Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú.
- Palani, K., Harbaum-Piayda, B., Meske, D., Keppler, J. K., Bockelmann, W., Heller, K. J., & Schwarz, K. (june, 2016). Influence of fermentation on glucosinolates and
- Olivier, C., Vaughn, S. F., Mizubuti, E. S., & Loria, R. (1999). Variation in allyl isothiocyanate production within Brassica species and correlation with fungicidal activity. *Journal of Chemical Ecology*, 25(12), 2687-2701. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.06.012
- Palop, M. L., Smiths, J. P., & ten Brink, B. (july, 1995). Degradation of sinigrin by *Lactobacillus agilis* strain R16. *International journal of food* doi: 10.1016/0168-1605(95)00123-2
- Parra Huertas, R. A. (2010). Review. bacterias acido lacticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 8(1), 93-105. Recuperado en: <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/724>
- Patai S. (2010). *The Chemistry of Cyanates and Their Thio Derivatives*; John Wiley & Sons: New York, 1997; Chap 18. Recuperado en: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300559071>
- Pereira, F. M. V., Rosa, E., Fahey, J. W., Stephenson, K. K., Carvalho, R., & Aires, A. (september, 2002). Influence of temperature and ontogeny on the levels of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) sprouts and their effect on the induction of mammalian phase 2 enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6239-6244. doi: 10.1021/jf020309x

- Piasecka, A., Kachlicki, P., Stobiecki, M. (january, 2019). Analytical methods for detection of plant metabolomes changes in response to biotic and abiotic stresses, 20(2): 379. doi: 10.3390/ijms20020379
- Piekarska, A., Kołodziejski, D., Pilipczuk, T., Bodnar, M., Konieczka, P., Kusznerewicz, B., ... & Bartoszek, A. (may, 2014). The influence of selenium addition during germination of Brassica seeds on health-promoting potential of sprouts. International journal of food sciences and nutrition, 65(6), 692-702. Doi: 10.3109/09637486.2014.917148
- Pocock, K., Heaney, R. K., Wilkinson, A. P., Beaumont, J. E., Vaughan, J. G., & Fenwick, G. R. (april, 1987). Changes in myrosinase activity and isoenzyme pattern, glucosinolate content and the cytology of myrosin cells in the leaves of heads of three cultivars of English white cabbage. Journal of the Science of Food and Agriculture, 41(3), 245-257. doi: 10.1002/jsfa.2740410307
- Pyo, Y. H., Lee, T. C., & Lee, Y. C. (june, 2005). Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with  $\beta$ -glucosidase-producing lactic acid bacteria. Food Research International, 38(5), 551-559. doi: 10.1016/j.foodres.2004.11.008
- Quan. Vo, Q. V., Trenerry, C., Rochfort, S., Wadeson, J., Leyton, C., & Hughes, A. B. (august, 2013). Synthesis and anti-inflammatory activity of aromatic glucosinolates. Bioorganic & medicinal chemistry, 21(19), 5945-5954. doi: 10.1016/j.bmc.2013.07.049
- Radojčić, I., Glivetić, T., Delonga, K., & Vorkapić-Furač, J. (february, 2008). Glucosinolate Profiles, Myrosinase and Peroxidase Activity in Horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.) Plantlets, Tumour and Teratoma Tissues. Food Technology & Biotechnology, 46(3). Recuperado en: : [https://www.researchgate.net/publication/236669599\\_Glucosinolate\\_Profiles\\_Myrosinase\\_and\\_Peroxidase\\_Activity\\_in\\_Horseradish\\_Armoracia\\_lapathifolia\\_Gilib\\_Plantlets\\_Tumour\\_and\\_Teratoma\\_Tissues](https://www.researchgate.net/publication/236669599_Glucosinolate_Profiles_Myrosinase_and_Peroxidase_Activity_in_Horseradish_Armoracia_lapathifolia_Gilib_Plantlets_Tumour_and_Teratoma_Tissues)

- Ramakrishna, A., Aswathanarayana, G.R. (november, 2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11): 1720-173. doi: 10.4161/psb.6.11.17613
- Ramallo, R., Wathelet, J. P., Le Boulengé, E., Torres, E., Marlier, M., Ledent, J. F., & Larondelle, Y. (april, 2004). Glucosinolates in isano (*Tropaeolum tuberosum*) tubers: qualitative and quantitative content and changes after maturity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(7), 701-706. doi: 10.1002/jsfa.1691
- Ramón C, F. C. (2017). Efecto del estrés abiótico post-cosecha en las características físico-químicas y de algunos metabolitos primarios de mashua morada (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) (Tesis ingeniero). Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú.
- Rask, L., Andréasson, E., Ekbom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B., & Meijer, J. (january, 2000). Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant molecular biology*, 42(1), 93-114. doi: 10.1023/A:1006380021658
- Reyes, M., Gómez-Sánchez, I., Espinoza, C., Bravo, F., & Ganoza, L. (2009). Tablas peruanas de composición de alimentos. Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud, Lima. Recuperado en: <https://repositorio.ins.gob.pe/handle/INS/1034>
- Roca, W., & Manrique, I. (2005). Valorización de los recursos genéticos de raíces y tubérculos andinos para la nutrición y la salud. *Agrociencia-Sitio en Reparación*, 9(1-2), 195-201. Recuperado en: <http://164.73.52.4/agrociencia/index.php/directorio/article/view/293>
- Rodman, J. E., Karol, K. G., Price, R. A., & Sytsma, K. J. (september, 1996). Molecules, morphology, and Dahlgren's expanded order Capparales. *Systematic Botany*, 289-307. doi: 10.2307/2419660

- Rosa, E. A. S.; Heaney, RK; Fenwick, GR and Portas CA. M. (1997). Glucosinolate in crop plants. Hort Rev, 19, 99-215. Recuperado en: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10029135592/#cit>
- Rouzaud, G., Rabot, S., Ratcliffe, B., & Duncan, A. J. (march, 2003). Influence of plant and bacterial myrosinase activity on the metabolic fate of glucosinolates in gnotobiotic rats. British Journal of Nutrition, 90(2), 395-404. doi: 10.1079/BJN2003900
- Rybarczyk-Plonska, A., Hagen, S. F., Borge, G. I. A., Bengtsson, G. B., Hansen, M. K., & Wold, A. B. (january,2016). Glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) as affected by postharvest temperature and radiation treatments. Postharvest Biology and Technology, 116, 16-25. doi: 10.1016/j.postharvbio.2015.12.010
- Sánchez, E. P., Núñez, D., Cruz, R. O., Torres, M. A., & Herrera, E. V. (mayo, 2017). Simulación y Conteo de Unidades Formadoras de Colonias. ReCIBE. Revista electrónica de Computación, Informática, Biomédica y Electrónica, 1(1), 97-111. Recuperado en: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/5122/512253717006/512253717006.pdf>
- Santhi S., & Shanthi priya S. (march, 2014). High performance liquid chromatography in the study of benzylisothiocyanate from *Raphanus sativus* (white radish). SIRJ-APBBP. 1(4): 28-33. doi: 10.22127/RJP.2018.58511
- Seneviratne, M., Rajakaruna, N., Rizwan, M., Madawala, H.M.S.P., Ok, Y.S., Vithanage, M. (july, 2019). Heavy metal-induced oxidative stress on seed germination and seedling development: a critical review. Environmental geochemistry and health, 41(4): 1813-1831. doi: 10.1007/s10653-017-0005-8
- Sharma, A., Sharma, A., Yadav, P., & Singh, D. (2016). Isothiocyanates in Brassica: Potential anti-cancer agents. Asian pacific Journal of cancer prevention, 17(9), 4507-4510. Recuperado en: [http://journal.waocp.org/article\\_40428\\_1138c75858015810fffb6e32a1c3caa7.pdf](http://journal.waocp.org/article_40428_1138c75858015810fffb6e32a1c3caa7.pdf)

- Singh, AK, Dhanapal, S., Yadav, BS. (december, 2019). The dynamic responses of plant physiology and metabolism during the progression of environmental stress. *Molecular biology reports*, 1-12. doi: 10.1007/s11033-019-05198-4
- Sodhi, Y. S., Mukhopadhyay, A., Arumugam, N., Verma, J. K., Gupta, V., Pental, D., & Pradhan, A. K. (june, 2002). Genetic analysis of total glucosinolate in crosses involving a high glucosinolate Indian variety and a low glucosinolate line of *Brassica juncea*. *Plant breeding*, 121(6), 508-511. Doi: 10.1046/j.1439-0523.2002.00747.x
- Sofrata, A., Santangelo, E. M., Azeem, M., Borg-Karlson, A. K., Gustafsson, A., & Pütsep, K. (august, 2011). Benzyl isothiocyanate, a major component from the roots of *Salvadora persica* is highly active against Gram-negative bacteria. *PLoS One*, 6(8), e23045. doi: 10.1371/journal.pone.0023045
- Sønderby, I. E., Geu-Flores, F., & Halkier, B. A. (march, 2010). Biosynthesis of glucosinolates—gene discovery and beyond. *Trends in plant science*, 15(5), 283-290. doi: 10.1016/j.tplants.2010.02.005
- Song, L., & Thornalley, P. J. (february, 2007). Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of Brassica vegetables. *Food and chemical toxicology*, 45(2), 216-224. doi: 10.1016/j.fct.2006.07.021
- Sperling, C. R., & King, S. R. (1990). Andean tuber crops: worldwide potential. In *Advances in new crops. Proceedings of the first national symposium 'New crops: research, development, economics'*, USA, (pp. 428-435). Recuperado en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/welcome/?target=%2fcabdirect%2fabstract%2f19911620353>
- Staack, R., Kingston, S., Wallig, M. A., & Jeffery, E. H. (march, 1998). A comparison of the individual and collective effects of four glucosinolate breakdown products from brussels sprouts on induction of detoxification enzymes. *Toxicology and applied pharmacology*, 149(1), 17-23. doi: 10.1006/taap.1997.8340

- Stoewsand, G. S. (june, 1995). Bioactive organosulfur phytochemicals in Brassica oleracea vegetables—a review. *Food and chemical toxicology*, 33(6), 537-543. doi: 10.1016/0278-6915(95)00017-V
- Svensson, L., Sekwati-Monang, B., Lutz, D. L., Schieber, A., & Ganzle, M. G. (august, 2010). Phenolic acids and flavonoids in nonfermented and fermented red sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 9214-9220. doi: 10.1021/jf101504v
- Tabart, J., Pincemail, J., Kevers, C., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (august, 2018). Processing effects on antioxidant, glucosinolate, and sulforaphane contents in broccoli and red cabbage. *European Food Research and Technology*, 244(12), 2085-2094. doi: 10.1007/s00217-018-3126-0
- Tan, J. S., Yeo, C. R., & Popovich, D. G. (may, 2017). Fermentation of protopanaxadiol type ginsenosides (PD) with probiotic *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus rhamnosus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(13), 5427-5437. doi: 10.1007/s00253-017-8295-4
- Tang, C. S., Bhothipaksa, K., & Frank, H. A. (march, 1972). Bacterial degradation of benzyl isothiocyanate. *Applied microbiology*, 23(6), 1145. Recuperado en: <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/am.23.6.1145-1148.1972>
- Tang, L., Paonessa, J. D., Zhang, Y., Ambrosone, C. B., & McCann, S. E. (august, 2013). Total isothiocyanate yield from raw cruciferous vegetables commonly consumed in the United States. *Journal of functional foods*, 5(4), 1996-2001. doi: 10.1016/j.jff.2013.07.011
- Tani, N., Ohtsuru, M., & Hata, T. (february, 1974). Isolation of myrosinase producing microorganism. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38(9), 1617-1622. doi: 10.1080/00021369.1974.10861387



- Tannock, G. W. (1999). The normal microflora: an introduction. In Tannock G.W. (eds) Medical importance of the normal microflora (pp. 1-23). Springer, Boston, MA. doi: 10.1007/978-1-4757-3021-0\_1
- Tapia Núñez, M., Fries, A., Mazar, I., & Rosell, C. (2007). Guía de campo de los cultivos andinos. Recuperado en: <https://bit.ly/33YpQz3>
- Taylor, S. L. (2009). Advances in food and nutrition research. Recuperado en: <https://www.elsevier.com/books/advances-in-food-and-nutrition-research/taylor/978-0-12-374441-8>
- Thangstad, O. P., Iversen, T. H., Slupphaug, G., & Bones, A. (january,1990). Immunocytochemical localization of myrosinase in *Brassica napus* L. *Planta*, 180(2), 245-248. doi: 10.1007/BF00194003
- Tkhruni, F. N., Aghajanyan, A. E., Balabekyan, T. R., Khachatryan, T. V., & Karapetyan, K. J. (july, 2020). Characteristic of bacteriocins of *Lactobacillus rhamnosus* BTK 20-12 potential probiotic strain. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12(2), 716-724. doi: 10.1007/s12602-019-09569-y
- Toivonen, P. M., & Hodges, D. M. (2011). *Abiotic stress in harvested fruits and vegetables*. Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations. InTech (Eds). China. (pp. 39-58). Recuperado en: <https://bit.ly/3ewuYfT>
- Trivelli, C., & Smith, S. (1997). Cultivos andinos y el mercado: El caso del ulluco en la sierra sur del Perú. Lima, Perú, Centro Internacional de la Papa (CIP). Recuperado en: <https://bit.ly/3pynvDg>
- Troncoso, R., Espinoza, C., Sánchez-Estrada, A., Tiznado, M. E., & García, H. S. (march, 2005). Analysis of the isothiocyanates present in cabbage leaves extract and their potential application to control *Alternaria* rot in bell peppers. *Food Research International*, 38(6), 701-708. doi: 10.1016/j.foodres.2005.02.004

- Tsangalis, D., Ashton, J. F., McGill, A. E. J., & Shah, N. P. (july, 2002). Enzymic transformation of isoflavone phytoestrogens in soymilk by  $\beta$ -glucosidase-producing bifidobacteria. *Journal of Food Science*, 67(8), 3104-3113. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb08866.x
- Turpo, G. F., & Gemio, S. R. (2015). *Compuestos cianogénicos en vegetales comestibles (cereal, drupas y tubérculos) y su cuantificación mediante métodos ópticos (tesis doctoral, Universidad mayor de san andrés)*. Recuperado en: <https://repositorio.umsa.bo/xmlui/bitstream/handle/123456789/9300/PG-1584-Turpo%20Gutierrez%2C%20Fernando.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Valcárcel-Yamani, B., Rondán-Sanabria, G. G., & Finardi-Filho, F. (september, 2013). The physical, chemical and functional characterization of starches from Andean tubers: Oca (*Oxalis tuberosa* Molina), olluco (*Ullucus tuberosus* Caldas) and mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(3), 453-464. Recuperado en: <https://www.scielo.br/j/bjps/a/Y7S58ndpf5TzqDQkMfGMbrf/?format=pdf&lang=en>
- Van Beek, S., & Priest, F. G. (december, 2000). Decarboxylation of substituted cinnamic acids by lactic acid bacteria isolated during malt whisky fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5322-5328. doi: 10.1128/AEM.66.12.5322-5328.2000
- Van De Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (august, 2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1), 187-216. doi: 10.1023/A:1020631532202
- Vaughan, E. E., Heilig, H. G., Ben-Amor, K., & De Vos, W. M. (august, 2002). Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 477-490. doi: 10.1016/j.fmrre.2005.04.009

- Veeranki, O. L., Bhattacharya, A., Tang, L., Marshall, J. R., & Zhang, Y. (february, 2015). Cruciferous vegetables, isothiocyanates, and prevention of bladder cancer. *Current pharmacology reports*, 1(4), 272-282. doi: 10.1007/s40495-015-0024-z
- Verkerk, R., & Dekker, M. (2008). Glucosinolates. *Bioactive compounds in foods*, 31-47. Recuperado en: <https://bit.ly/3n0H0D5>
- Verkerk, R., Dekker, M., & Jongen, W. M. F. (june, 2001). Post-harvest increase of indolyl glucosinolates in response to chopping and storage of Brassica vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 953-958. doi: 10.1002/jsfa.854
- Verkerk, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., ... & Dekker, M. (September, 2009). Glucosinolates in Brassica vegetables: the influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Molecular nutrition & food research*, 53(S2), S219-S219. doi: 10.1002/mnfr.200800065
- Villarreal-García, D., Nair, V., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (february, 2016). Plants as biofactories: Postharvest stress-induced accumulation of phenolic compounds and glucosinolates in broccoli subjected to wounding stress and exogenous phytohormones. *Frontiers in plant science*, 7, 45. doi: 10.3389/fpls.2016.00045
- Wathelet, J. P., Iori, R., Leoni, O., Quinsac, A., & Palmieri, S. (2004). Guidelines for glucosinolate analysis in green tissues used for biofumigation. *Agroindustria*, 3(3), 257-266. Recuperado en: <http://hdl.handle.net/2268/16127>
- Wielanek, M., & Urbanek, H. (april, 2006). Enhanced glucotropaeolin production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus* L. by combining elicitation and precursor feeding. *Plant cell, tissue and organ culture*, 86(2), 177-186. doi: 10.1007/s11240-006-9106-2

- Wittstock, U., & Burow, M. (july, 2010). Glucosinolate breakdown in *Arabidopsis*: mechanism, regulation and biological significance. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 8. doi: 10.1199/tab.0134
- Wittstock, U., & Halkier, B. A. (may, 2002). Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends in plant science*, 7(6), 263-270. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02273-2
- Wittstock, U., Kurzbach, E., Herfurth, A.-M., & Stauber, E. J. (2016). Glucosinolate Breakdown. *Advances in botanical research*, 80, 125–169. doi:10.1016/bs.abr.2016.06.006
- Wu, R., Zhang, W., Sun, T., Wu, J., Yue, X., Meng, H., & Zhang, H. (april, 2011). Proteomic analysis of responses of a new probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang to low acid stress. *International journal of food microbiology*, 147(3), 181-187. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.003
- Wu, Y., Shen, Y., Zhu, Y., Mupunga, J., Zou, L., Liu, C., ... & Mao, J. (february, 2019). Broccoli ingestion increases the glucosinolate hydrolysis activity of microbiota in the mouse gut. *International journal of food sciences and nutrition*, 70(5), 585-594. doi: 10.1080/09637486.2018.1554624
- Xu, Z., Escamilla-Treviño, L., Zeng, L., Lalgondar, M., Bevan, D., Winkel, B., & Esen, A. (may, 2004). Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. *Plant molecular biology*, 55(3), 343-367. doi: 10.1007/s11103-004-0790-1
- Yábar, E., Pedreschi, R., Chirinos, R., & Campos, D. (february, 2011). Glucosinolate content and myrosinase activity evolution in three maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotypes during preharvest, harvest and postharvest drying. *Food chemistry*, 127(4), 1576-1583. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.02.021
- Yadav, B.S., Lahav, T., Reuveni, E., Chamovitz, D. A., Freilich, S. (september, 2016). Multidimensional patterns of metabolic response in abiotic stress-induced growth

of *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 92(6): 689-699. doi: 10.1007/s11103-016-0539-7

Yang, J., Zhu, Z., Wang, Z., Zhu, B. (december, 2010). Effects of storage temperature on the contents of carotenoids and glucosinolates in Pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* var. *communis*). *Journal of food biochemistry*, 34(6): 1186-1204. doi: 10.1111/j.1745-4514.2010.00358.x

Yang, L., Wen, K.S., Ruan, X., Zhao, Y.X., Wei, F., Wang, Q. (march, 2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4): 762. doi: 10.3390/molecules23092245

Ye, J. H., Huang, L. Y., Terefe, N. S., & Augustin, M. A. (february, 2019). Fermentation-based biotransformation of glucosinolates, phenolics and sugars in retorted broccoli puree by lactic acid bacteria. *Food chemistry*, 286, 616-623. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.02.030

Zambrano, E. (2004). Estudio de la variabilidad de melloco (*Ullucus tuberosus* Caldas), oca (*Oxalis tuberosa* Molna) y mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon) en finca de agricultores (Tesis de ingeniero, universidad central del ecuador). Recuperada en: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/997/1/iniapsctZ23e.pdf>

Zhai, Z., Douillard, F. P., An, H., Wang, G., Guo, X., Luo, Y., & Hao, Y. (september, 2014). Proteomic characterization of the acid tolerance response in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CAUH1 and functional identification of a novel acid stress-related transcriptional regulator L db0677. *Environmental microbiology*, 16(6), 1524-1537. doi: 10.1111/1462-2920.12280

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: ANALISIS ESTADÍSTICO HUMEDAD DE LA HARINA DE MASHUA

#### Análisis de varianza para la humedad

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 62.8944           | 6  | 10.4824        | 2.55    | 0.0703  |
| Intra grupos  | 57.6514           | 14 | 4.11796        |         |         |
| Total (Corr.) | 120.546           | 20 |                |         |         |

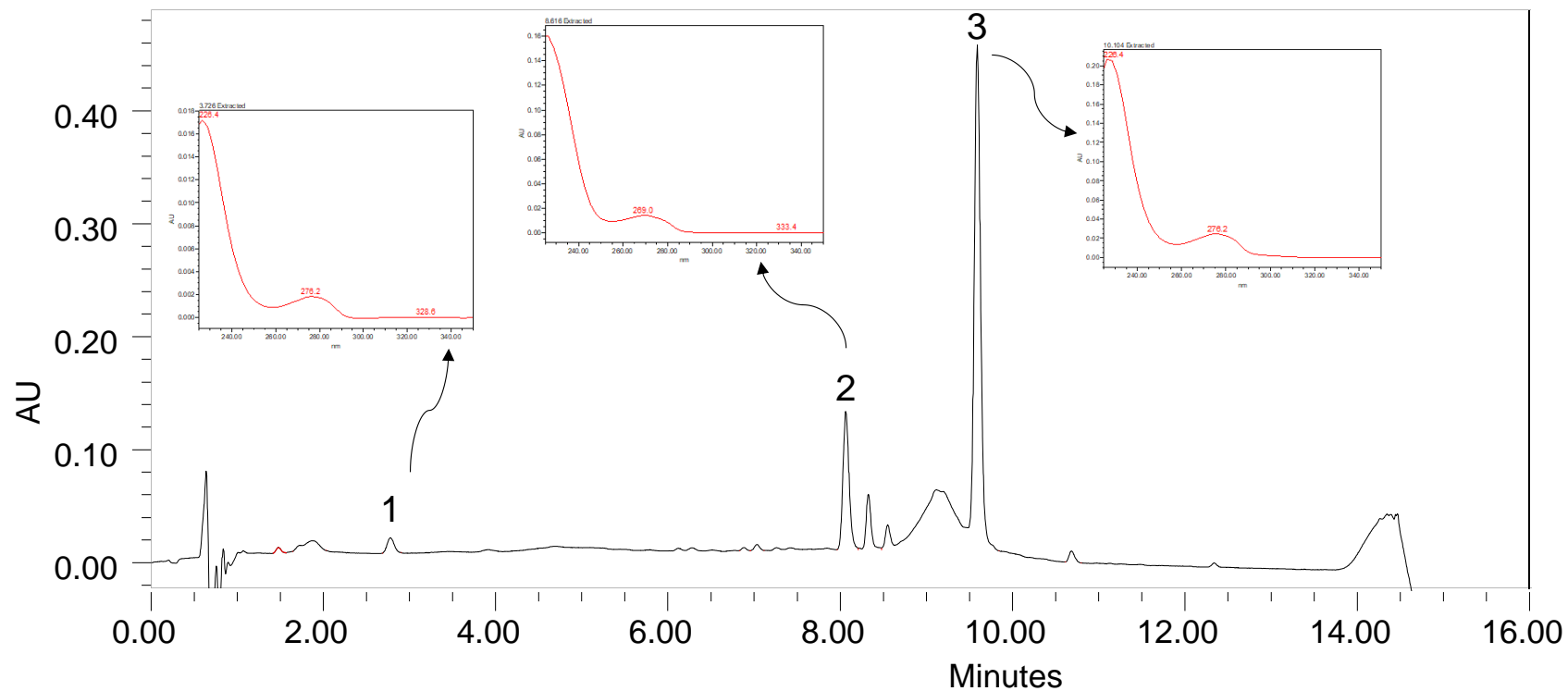
#### Pruebas de Múltiple Rangos para Humedad por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Días | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|------|-------|---------|-------------------|
| 12   | 3     | 89.0619 | X                 |
| 10   | 3     | 93.1482 | X                 |
| 8    | 3     | 93.2228 | X                 |
| 2    | 3     | 93.7445 | X                 |
| 0    | 3     | 93.762  | X                 |
| 4    | 3     | 94.3515 | X                 |
| 6    | 3     | 94.5921 | X                 |

## ANEXO 2: CROMATOGRAMA DE LOS GLUCOSINOLATOS OBTENIDO POR UPLC®-PDA (229NM) DE MASHUA ALMACENADA A DIFERENTES TIEMPOS

Pico 1: Glucosinalbina, Pico 2: Glucotropaeolina y Pico 3: Glucoaubrietina



**ANEXO 3:ANÁLISIS ESTADÍSTICO CONTENIDO DE GLUCOSINOLATOS  
TOTALES**

**Análisis de varianza para el contenido de glucosinolatos totales por días**

| Fuente        | Suma de<br>cuadrados | Gl | Cuadrado<br>medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|----------------------|----|-------------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 2050.58              | 6  | 341.763           | 126.85  | 0.0000  |
| Intra grupos  | 37.7182              | 14 | 2.69416           |         |         |
| Total (Corr.) | 2088.3               | 20 |                   |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para glucosinolatos totales por días**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Días | Casos | Media   | Grupos homogéneos |
|------|-------|---------|-------------------|
| 12   | 3     | 26.8833 | X                 |
| 6    | 3     | 34.0967 | X                 |
| 2    | 3     | 37.6333 | X                 |
| 0    | 3     | 48.59   | X                 |
| 4    | 3     | 50.2967 | X                 |
| 8    | 3     | 51.7267 | XX                |
| 10   | 3     | 55.5333 | X                 |



#### ANEXO 4:ANÁLISIS ESTADÍSTICO CONTENIDO DE GLUCOUBRIETINA

##### Análisis de varianza para el contenido de glucoubrietina por días

| Fuente        | Suma de cuadrados | Gl | Cuadrado medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 2080.68           | 6  | 346.78         | 200.97  | 0.0000  |
| Intra grupos  | 24.1573           | 14 | 1.72552        |         |         |
| Total (Corr.) | 2104.84           | 20 |                |         |         |

##### Pruebas de múltiples rangos para glucoubrietina por días

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Días | Casos | Media   | Grupos homogéneos |
|------|-------|---------|-------------------|
| 12   | 3     | 19.434  | X                 |
| 6    | 3     | 25.841  | X                 |
| 2    | 3     | 29.7923 | X                 |
| 4    | 3     | 40.8883 | X                 |
| 0    | 3     | 41.38   | X                 |
| 8    | 3     | 44.465  | X                 |
| 10   | 3     | 48.3817 | X                 |

#### ANEXO 5:ANÁLISIS ESTADÍSTICO CONTENIDO DE GLUCOSINALBINA

##### Análisis de varianza para el contenido de glucosinalbina por días

| Fuente        | Suma de cuadrados | Gl | Cuadrado medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 0.434781          | 6  | 0.0724635      | 116.16  | 0.0000  |
| Intra grupos  | 0.00873333        | 14 | 0.00062381     |         |         |
| Total (Corr.) | 0.443514          | 20 |                |         |         |

## Pruebas de múltiples rangos para glucosinalbina por días

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Días | Casos | Media    | Grupos homogéneos |
|------|-------|----------|-------------------|
| 12   | 3     | 0.114    | X                 |
| 6    | 3     | 0.241333 | X                 |
| 0    | 3     | 0.343667 | X                 |
| 4    | 3     | 0.426333 | X                 |
| 10   | 3     | 0.451667 | X                 |
| 2    | 3     | 0.461667 | X                 |
| 8    | 3     | 0.579667 | X                 |

## ANEXO 6: ANÁLISIS ESTADÍSTICO CONTENIDO DE GLUCOTROPAEOLINA

### Análisis de varianza para el contenido de glucotropaeolina por días

| Fuente        | Suma de cuadrados | Gl | Cuadrado medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 12.5322           | 6  | 2.0887         | 1.49    | 0.2520  |
| Intra grupos  | 19.642            | 14 | 1.403          |         |         |
| Total (Corr.) | 32.1742           | 20 |                |         |         |

## ANEXO 7:ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD MIROSINASA

### Análisis de varianza para la actividad mirosinasa por días

| Fuente        | Suma de cuadrados | Gl | Cuadrado medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 19.9193           | 6  | 3.31989        | 631.50  | 0.0000  |
| Intra grupos  | 0.0736            | 14 | 0.00525714     |         |         |
| Total (Corr.) | 19.9929           | 20 |                |         |         |

### Pruebas de múltiples rangos para actividad mirosinasa por días

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Días | Casos | Media    | Grupos homogéneos |
|------|-------|----------|-------------------|
| 0    | 3     | 0.286667 | X                 |
| 2    | 3     | 0.413333 | X                 |
| 6    | 3     | 0.426667 | X                 |
| 4    | 3     | 0.476667 | X                 |
| 10   | 3     | 0.966667 | X                 |
| 12   | 3     | 1.72     | X                 |
| 8    | 3     | 3.16667  | X                 |

## ANEXO 8: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL 4 METOXI-BENCIL ISOTIOCIANATO DE LA MASHUA

### Análisis de varianza para el contenido de 4-metoxibencil isotiocianato por días

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 22.7405           | 6  | 3.79008        | 168.41  | 0.0000  |
| Intra grupos  | 0.315067          | 14 | 0.0225048      |         |         |
| Total (Corr.) | 23.0555           | 20 |                |         |         |

### Pruebas de múltiples rangos para 4-metoxibencil isotiocianato por días

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Días | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|------|-------|---------|-------------------|
| 12   | 3     | 632.17  | X                 |
| 8    | 3     | 1634.36 | X                 |
| 2    | 3     | 1669.67 | X                 |
| 0    | 3     | 2892.08 | X                 |
| 6    | 3     | 3221.35 | XX                |
| 10   | 3     | 3339.03 | XX                |
| 4    | 3     | 3638.54 | X                 |

**ANEXO 9: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL 4-METOXIBENCENO-ACETONITRILO DE LA MASHUA**

**Análisis de varianza para el contenido de 4-metoxibenceno-acetonitrilo por días**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 0.00269124        | 6  | 0.00044854     | 39.91   | 0.0000  |
| Intra grupos  | 0.000157333       | 14 | 0.0000112381   |         |         |
| Total (Corr.) | 0.00284857        | 20 |                |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para 4-metoxibenceno-acetonitrilo por días**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Días | Casos | Media     | Grupos Homogéneos |
|------|-------|-----------|-------------------|
| 12   | 3     | 0.049333  | X                 |
| 8    | 3     | 0.054333  | XX                |
| 10   | 3     | 0.055333  | XX                |
| 6    | 3     | 0.056333  | XX                |
| 4    | 3     | 0.062     | X                 |
| 0    | 3     | 0.0746667 | X                 |
| 2    | 3     | 0.083     | X                 |

**ANEXO 10: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL (4-METOXIBENCILALCOHOL) METIL ÉTER DE LA MASHUA**

**Análisis de varianza para el contenido de (4-metoxibencilalcohol) metil éter por días**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 0.0167716         | 6  | 0.00279527     | 24.09   | 0.0000  |
| Intra grupos  | 0.00162467        | 14 | 0.000116048    |         |         |
| Total (Corr.) | 0.0183963         | 20 |                |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para (4-metoxibencilalcohol) metil éter por días**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Días | Casos | Media    | Grupos Homogéneos |
|------|-------|----------|-------------------|
| 4    | 3     | 0.151333 | X                 |
| 6    | 3     | 0.171    | XX                |
| 8    | 3     | 0.173    | XX                |
| 2    | 3     | 0.195    | XX                |
| 12   | 3     | 0.220667 | XX                |
| 0    | 3     | 0.221333 | XX                |
| 10   | 3     | 0.230667 | X                 |

**ANEXO 11: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL BENCIL ISOTIOCIANATO DE LA MASHUA**

**Análisis de varianza para el contenido de bencil isotiocianato por días**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 0.00219514        | 6  | 0.000365857    | 120.05  | 0.0000  |
| Intra grupos  | 0.0000426667      | 14 | 0.00000304762  |         |         |
| Total (Corr.) | 0.00223781        | 20 |                |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para bencil isotiocianato por días**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Días | Casos | Media     | Grupos Homogéneos |
|------|-------|-----------|-------------------|
| 12   | 3     | 0.133333  | X                 |
| 0    | 3     | 0.0136667 | X                 |
| 6    | 3     | 0.02      | X                 |
| 2    | 3     | 0.02      | X                 |
| 10   | 3     | 0.0253333 | X                 |
| 4    | 3     | 0.032     | X                 |
| 8    | 3     | 0.0443333 | X                 |

**ANEXO 12: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL BENCENO ACETALDEHIDO DE LA MASHUA**

**Análisis de varianza para el contenido de benceno acetaldehido por días**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 217.381           | 6  | 36.2302        | 20.67   | 0.0000  |
| Intra grupos  | 24.5338           | 14 | 1.75241        |         |         |
| Total (Corr.) | 241.915           | 20 |                |         |         |

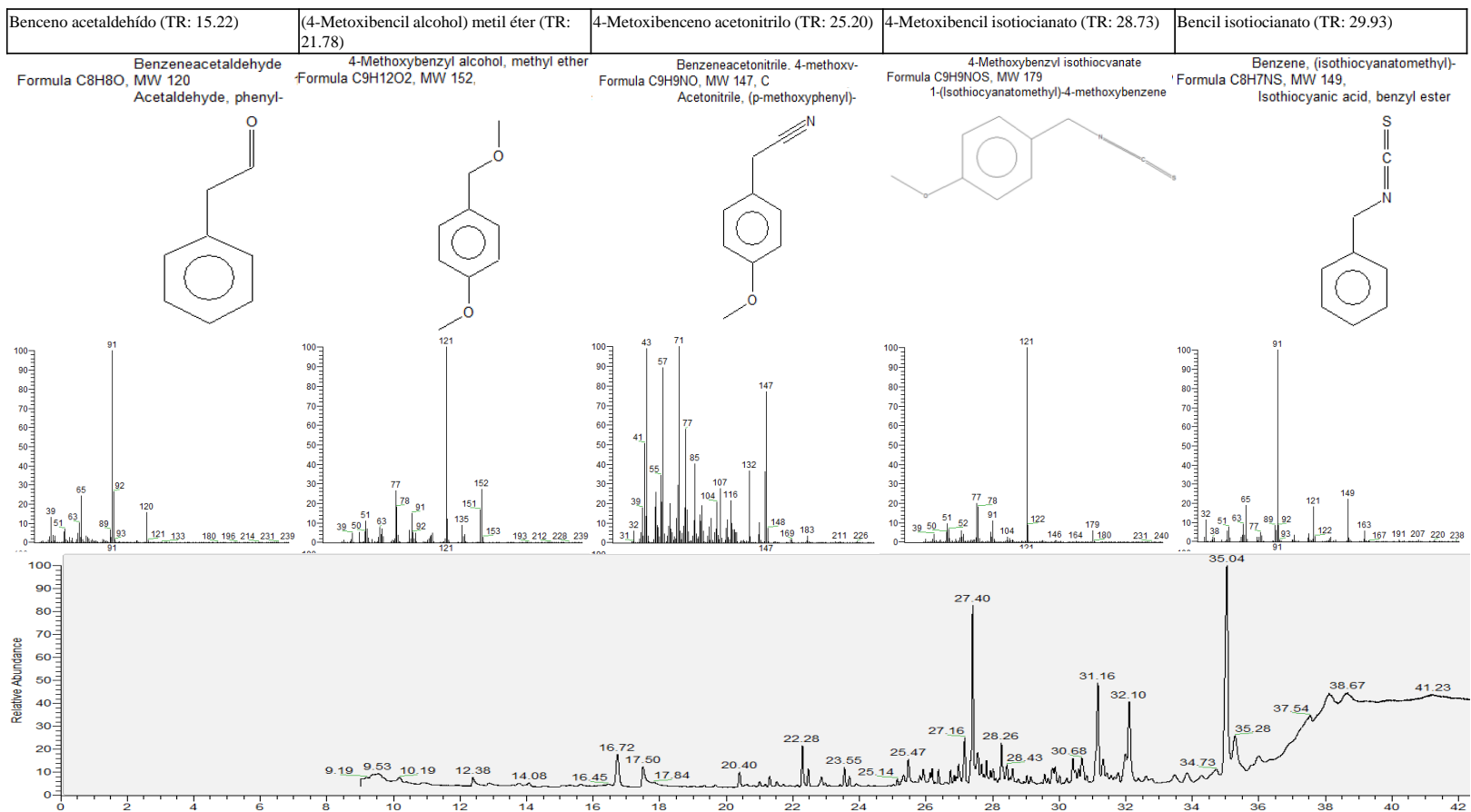
**Pruebas de múltiples rangos para benceno acetaldehido por días**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Días | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|------|-------|---------|-------------------|
| 8    | 3     | 4.62    | X                 |
| 10   | 3     | 5.26    | X                 |
| 2    | 3     | 7.98    | X                 |
| 4    | 3     | 9.03667 | XX                |
| 0    | 3     | 11.3967 | XX                |
| 12   | 3     | 13.03   | X                 |
| 6    | 3     | 13.0667 | X                 |



## ANEXO 13: CROMATOGRAMA Y ESPECTROS DE MASA OBTENIDOS POR CG-MS DE LOS DERIVADOS DE GLUCOSINOLATOS DE MASHUA



**ANEXO 14: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DEL CONSUMO DE GLUCOAUBRIETINA DESPUÉS DE LA FERMENTACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS**

**Análisis de varianza porcentaje del consumo de glucoaubrietina después de la fermentación de bacterias lácticas**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 2758.27           | 5  | 551.655        | 267.48  | 0.0000  |
| Intra grupos  | 24.7493           | 12 | 2.06244        |         |         |
| Total (Corr.) | 2783.02           | 17 |                |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para porcentaje del consumo de glucoaubrietina después de la fermentación de bacterias lácticas**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Bacteria  | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|---|-------|---------|-------------------|
| <i>Enterococcus mundtii</i> CWBI-B1431              | 3     | 8.53667 | X                 |
| <i>Enterococcus faecium</i> CWBI- B1430             | 3     | 17.1167 | X                 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> NRRL B-4496          | 3     | 22.1233 | X                 |
| <i>Lactobacillus casei</i> subsp casei NRRL B-1922C | 3     | 26.9567 | X                 |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> BIOSTAR®             | 3     | 35.59   | X                 |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG                   | 3     | 46.6833 | X                 |

**ANEXO 15: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DEL CONSUMO DE GLUCOSINOLATOS TOTALES DESPUÉS DE LA FERMENTACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS**

**Análisis de varianza porcentaje del consumo de glucosinolatos totales después de la fermentación de bacterias lácticas**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 2703.81           | 5  | 540.763        | 256.32  | 0.0000  |
| Intra grupos  | 25.3164           | 12 | 2.1097         |         |         |
| Total (Corr.) | 2729.13           | 17 |                |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para porcentaje del consumo de glucosinolatos totales después de la fermentación de bacterias lácticas**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Bacteria   | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|--|-------|---------|-------------------|
| <i>Enterococcus mundtii</i> CWBI-B1431             | 3     | 9.5     | X                 |
| <i>Enterococcus faecium</i> CWBI- B1430            | 3     | 18.04   | X                 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> NRRL B-4496         | 3     | 22.9933 | X                 |
| <i>Lactobacillus casei</i> subsp casei NRRL B-1922 | 3     | 27.7733 | X                 |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> BIOSTAR®            | 3     | 36.31   | X                 |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG                  | 3     | 47.2833 | X                 |

**ANEXO 16: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL RECUENTO MICROBIANO OBTENIDO DESPUÉS DE LA FERMENTACIÓN DE GLUCOSINOLATOS POR BACTERIAS LÁCTICAS**

**Análisis de varianza para el recuento microbiano después de la fermentación**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 1.6444            | 5  | 0.328889       | 2.20    | 0.1221  |
| Intra grupos  | 1.79333           | 12 | 0.149444       |         |         |
| Total (Corr.) | 3.43778           | 17 |                |         |         |

**ANEXO 17: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE pH DESPUÉS DE LA FERMENTACIÓN DE GLUCOSINOLATOS POR BACTERIAS LÁCTICAS**

**Análisis de varianza para pH después de la fermentación**

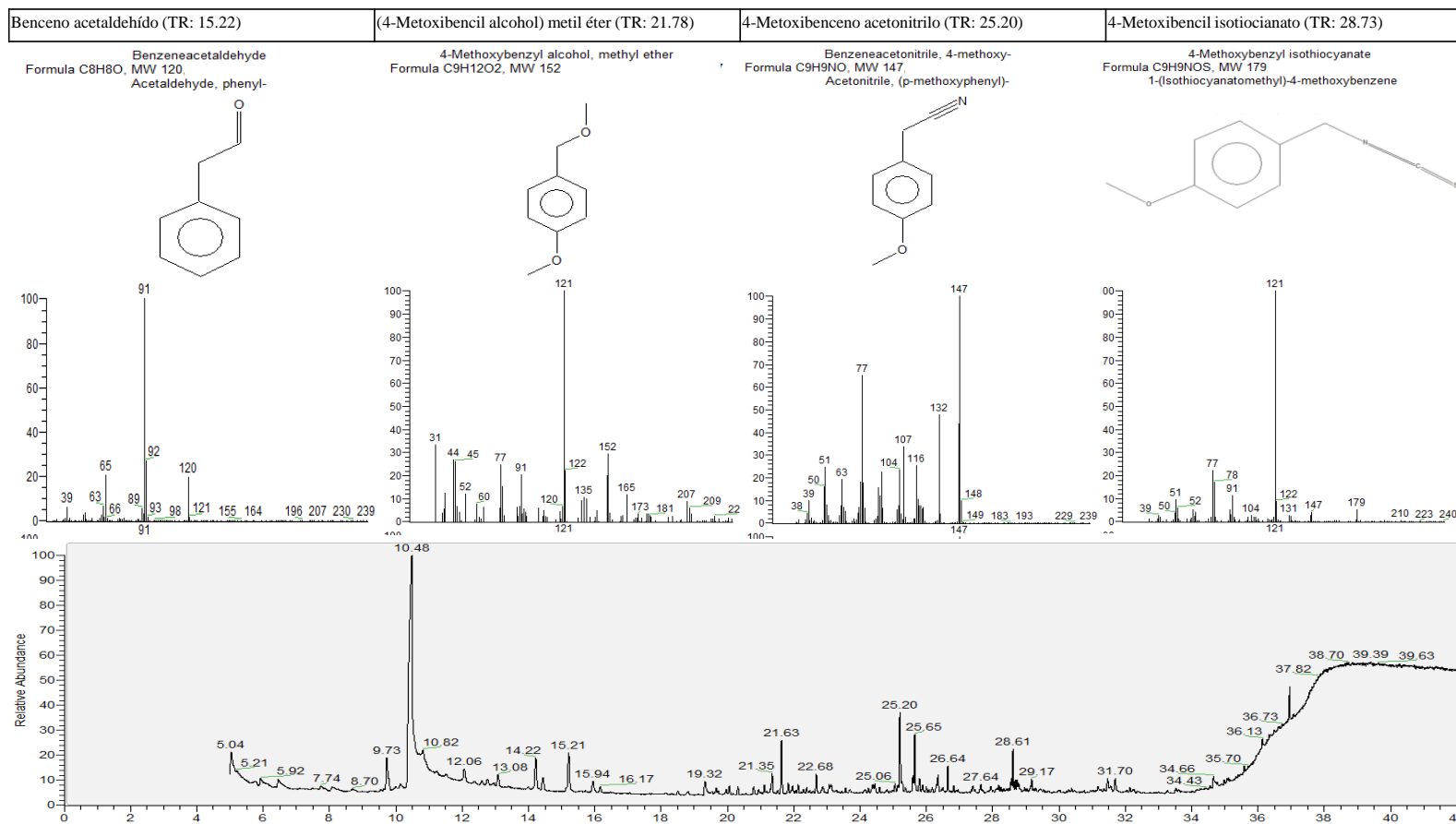
| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 4.11111           | 5  | 0.822222       | 59.20   | 0.0000  |
| Intra grupos  | 0.166667          | 12 | 0.0138889      |         |         |
| Total (Corr.) | 4.27778           | 17 |                |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para pH después de la fermentación**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Bacteria   | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|--|-------|---------|-------------------|
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG                  | 3     | 3.33333 | X                 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> NRRL B-4496         | 3     | 3.5     | X                 |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> BIOSTAR®            | 3     | 3.5     | X                 |
| <i>Lactobacillus casei</i> subsp casei NRRL B-1922 | 3     | 4.0     | X                 |
| <i>Enterococcus mundtii</i> CWBI-B1431             | 3     | 4.5     | X                 |
| <i>Enterococcus faecium</i> CWBI- B1430            | 3     | 4.5     | X                 |

## ANEXO 18: CROMATOGRAMA Y ESPECTROS DE MASA OBTENIDOS POR CG-MS DESPUÉS DE LA FERMENTACIÓN DE GLUCOSINOLATOS POR BACTERIAS LÁCTICAS



## **ANEXO 19: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE 4-METOXIBENCIL ISOTIOCIANATO PRODUCIDO POR BACTERIAS LÁCTICAS**

### **Análisis de varianza para 4-metoxibencil isotiocianato producido por bacterias lácticas**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 1.46278           | 5  | 0.292556       | 1.59    | 0.2366  |
| Intra grupos  | 2.21              | 12 | 0.184167       |         |         |
| Total (Corr.) | 3.67278           | 17 |                |         |         |

## **ANEXO 20: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL 4-METOXIBENCENO ACETONITRILO PRODUCIDO POR BACTERIAS LÁCTICAS**

### **Análisis de varianza para 4-metoxibenceno acetonitrilo producido por bacterias lácticas**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 10.914            | 5  | 2.18281        | 8.69    | 0.0011  |
| Intra grupos  | 3.0128            | 12 | 0.251067       |         |         |
| Total (Corr.) | 13.9268           | 17 |                |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para para 4-metoxibenceno acetonitrilo producido por bacterias**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Bacteria   | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|--|-------|---------|-------------------|
| <i>Lactobacillus plantarum</i> NRRL B-4496         | 3     | 6.10667 | X                 |
| <i>Enterococcus mundtii</i> CWBI-B1431             | 3     | 6.53333 | X                 |
| <i>Lactobacillus casei subsp casei</i> NRRL B-1922 | 3     | 6.76    | XX                |
| <i>Enterococcus faecium</i> CWBI- B1430            | 3     | 7.04333 | XXX               |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG                  | 3     | 8.08    | XX                |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> BIOSTAR®            | 3     | 8.22    | X                 |

**ANEXO 21. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL (4-METOXIBENCILALCOHOL) METIL ÉTER PRODUCIDO POR BACTERIAS LÁCTICAS**

**Análisis de varianza para (4-metoxibencilalcohol) metil éter producido por bacterias lácticas**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 0.211378          | 5  | 0.0422756      | 0.78    | 0.5799  |
| Intra grupos  | 0.646467          | 12 | 0.0538722      |         |         |
| Total (Corr.) | 0.857844          | 17 |                |         |         |

## ANEXO 22: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL BENCENO ACETALDEHÍDO PRODUCIDO POR BACTERIAS LÁCTICAS

### Análisis de varianza para benceno acetaldehído producido por bacterias lácticas

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 2404.05           | 5  | 480.811        | 56.62   | 0.0000  |
| Intra grupos  | 101.896           | 12 | 8.49134        |         |         |
| Total (Corr.) | 2505.95           | 17 |                |         |         |

### Pruebas de múltiples rangos para para benceno acetaldehído producido por bacterias lácticas

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Bacteria   | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|--|-------|---------|-------------------|
| <i>Enterococcus faecium</i> CWBI- B1430            | 3     | 10.53   | X                 |
| <i>Enterococcus mundtii</i> CWBI- B1431            | 3     | 23.11   | X                 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> NRRL B-4496         | 3     | 27.8367 | X                 |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> BIOSTAR®            | 3     | 36.3467 | X                 |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG                  | 3     | 41.1    | XX                |
| <i>Lactobacillus casei subsp casei</i> NRRL B-1922 | 3     | 44.44   | X                 |



**ANEXO 23: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PORCENTAJE DEL CONSUMO DE GLUCOSINOLATO DE LA MASHUA A PARTIR DEL *Lactobacillus rhamnosus* GG**

**Análisis de varianza para porcentaje del consumo de glucosinolatos por *Lactobacillus rhamnosus* GG**

| Fuente                    | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Efectos principales       |                   |    |                |         |         |
| A: concentración de GLS   | 31.30             | 2  | 15.649         | 4.98    | 0.014   |
| B: tiempo de Fermentación | 2077.41           | 4  | 519.353        | 165.27  | 0.000   |
| interacciones             |                   |    |                |         |         |
| AB                        | 934.90            | 8  | 116.863        | 37.19   | 0.000   |
| Residuos                  | 676.97            | 30 | 3.142          |         |         |
| Total (corregido)         | 3137.88           | 44 |                |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para el consumo de glucosinolatos por *Lactobacillus rhamnosus* GG a tiempos de fermentación**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo de fermentación | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|------------------------|-------|---------|-------------------|
| 6                      | 9     | 19.5778 | X                 |
| 24                     | 9     | 29.2222 | X                 |
| 30                     | 9     | 30.5889 | XX                |
| 48                     | 9     | 32.9667 | X                 |
| 54                     | 9     | 40.7    | X                 |

**Pruebas de múltiples rangos para el consumo de glucosinolatos por *Lactobacillus rhamnosus* GG a diferentes concentraciones**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Concentración de GLS | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|----------------------|-------|---------|-------------------|
| 0.01                 | 15    | 31.4441 | X                 |
| 0.05                 | 15    | 30.9198 | XX                |
| 0.1                  | 15    | 29.4720 | X                 |

**Pruebas de múltiples rangos para productos del consumo de GLS totales de *Lactobacillus rhamnosus* GG por interacción**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Interacción | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|-------------|-------|---------|-------------------|
| 0.01 6      | 3     | 213.593 | X                 |
| 0.05 6      | 3     | 200.991 | X                 |
| 0.01 54     | 3     | 157.899 | XX                |
| 0.01 6      | 3     | 150.262 | XX                |
| 0.05 30     | 3     | 135.122 | XXX               |
| 0.10 24     | 3     | 117.296 | XXX               |
| 0.01 30     | 3     | 104.519 | XX                |
| 0.01 48     | 3     | 98.392  | XX                |
| 0.10 48     | 3     | 73.651  | XXX               |
| 0.05 54     | 3     | 73.150  | XXX               |
| 0.05 48     | 3     | 72.464  | XXX               |
| 0.10 30     | 3     | 66.213  | XX                |
| 0.05 48     | 3     | 58.397  | XX                |
| 0.10 48     | 3     | 38.819  | XX                |
| 0.10 54     | 3     | 28.124  | X                 |

**ANEXO 24: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DENSIDAD ÓPTICA DE *Lactobacillus rhamnosus* GG EN MEDIO DE CULTIVOS CON GLUCOSINOLATOS**

**Análisis de varianza para la densidad óptica de *Lactobacillus rhamnosus* GG a una concentración de 0.01% durante la fermentación**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 75.6353           | 4  | 18.9088        | 44.15   | 0.0000  |
| Intra grupos  | 4.28248           | 10 | 0.428248       |         |         |
| Total (Corr.) | 79.9178           | 14 |                |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para la densidad óptica de *Lactobacillus rhamnosus* GG a una concentración 0.01% en el tiempo**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|--------|-------|---------|-------------------|
| 6      | 3     | 2.03    | X                 |
| 24     | 3     | 6.56    | X                 |
| 30     | 3     | 6.94    | XX                |
| 54     | 3     | 7.78667 | XX                |
| 48     | 3     | 8.37333 | X                 |

**Análisis de varianza para la densidad óptica de *Lactobacillus rhamnosus* GG a una concentración 0.05% en el tiempo**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 90.548            | 4  | 22.637         | 41.85   | 0.0000  |
| Intra grupos  | 5.40877           | 10 | 0.540877       |         |         |
| Total (Corr.) | 95.9568           | 14 |                |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para la densidad óptica de *Lactobacillus rhamnosus* GG a una concentración 0.05% en el tiempo**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|--------|-------|---------|-------------------|
| 6      | 3     | 1.73167 | X                 |
| 24     | 3     | 6.665   | X                 |
| 30     | 3     | 7.22667 | XX                |
| 54     | 3     | 7.67333 | XX                |
| 48     | 3     | 8.85333 | X                 |

**Análisis de varianza para la densidad óptica de *Lactobacillus rhamnosus* GG a una concentración 0.1% en el tiempo**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 151.754           | 4  | 37.9386        | 168.39  | 0.0000  |
| Intra grupos  | 2.25298           | 10 | 0.225298       |         |         |
| Total (Corr.) | 154.007           | 14 |                |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para la densidad óptica de *Lactobacillus rhamnosus* GG a una concentración 0.1% en el tiempo**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|--------|-------|---------|-------------------|
| 6      | 3     | 0.205   | X                 |
| 24     | 3     | 6.14    | X                 |
| 30     | 3     | 7.14667 | X                 |
| 54     | 3     | 8.49333 | X                 |
| 48     | 3     | 9.11333 | X                 |

**ANEXO 25: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RECuento MICROBIANO DE *Lactobacillus rhamnosus* GG EN MEDIO DE CULTIVOS CON GLUCOSINOLATOS**

**Análisis de varianza para el recuento microbiano (Log UFC/mL) de *Lactobacillus rhamnosus* GG durante la fermentación de glucosinolatos (0.01%)**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 6.72916           | 4  | 1.68229        | 59.80   | 0.0000  |
| Intra grupos  | 0.281333          | 10 | 0.0281333      |         |         |
| Total (Corr.) | 7.01049           | 14 |                |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para el recuento microbiano de *Lactobacillus rhamnosus* GG a una concentración 0.01% en el tiempo**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|--------|-------|---------|-------------------|
| 6      | 3     | 7.43    | X                 |
| 54     | 3     | 8.69667 | X                 |
| 30     | 3     | 8.70667 | X                 |
| 24     | 3     | 9.2     | X                 |
| 48     | 3     | 9.32    | X                 |

**Análisis de varianza para el recuento de *Lactobacillus rhamnosus* GG a una concentración 0.05% en el tiempo**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 14.2448           | 4  | 3.56121        | 14.08   | 0.0004  |
| Intra grupos  | 2.52947           | 10 | 0.252947       |         |         |
| Total (Corr.) | 16.7743           | 14 |                |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para el recuento microbiano de *Lactobacillus rhamnosus* GG a una concentración 0.05% en el tiempo**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|--------|-------|---------|-------------------|
| 6      | 3     | 7.56333 | X                 |
| 24     | 3     | 8.58333 | XX                |
| 54     | 3     | 8.91667 | X                 |
| 30     | 3     | 9.47333 | XX                |
| 48     | 3     | 10.51   | X                 |

**Análisis de varianza para el recuento microbiano de *Lactobacillus rhamnosus* GG a una concentración 0.1% en el tiempo**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 14.2021           | 4  | 3.55052        | 115.13  | 0.0000  |
| Intra grupos  | 0.3084            | 10 | 0.03084        |         |         |
| Total (Corr.) | 14.5105           | 14 |                |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para el recuento microbiano de *Lactobacillus rhamnosus* GG a una concentración 0.1% durante el tiempo**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|--------|-------|---------|-------------------|
| 6      | 3     | 7.57    | X                 |
| 30     | 3     | 9.28333 | X                 |
| 24     | 3     | 9.40667 | X                 |
| 48     | 3     | 9.67667 | X                 |
| 54     | 3     | 10.56   | X                 |

**ANEXO 26: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PH DEL MEDIO DE CULTIVO DE *Lactobacillus rhamnosus* GG EN PRESENCIA DE GLUCOSINOLATOS**

**Análisis de varianza para pH obtenido después de la fermentación de *Lactobacillus rhamnosus* GG a una concentración 0.01% en el tiempo**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 19.0778           | 5  | 3.81556        | 73.85   | 0.0000  |
| Intra grupos  | 0.62              | 12 | 0.0516667      |         |         |
| Total (Corr.) | 19.6978           | 17 |                |         |         |



**Pruebas de múltiples rangos para pH obtenido después de la fermentación de *Lactobacillus rhamnosus* GG a una concentración 0.01% en el tiempo**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|--------|-------|---------|-------------------|
| 54     | 3     | 2.56667 | X                 |
| 48     | 3     | 3.13333 | XX                |
| 24     | 3     | 3.53333 | X                 |
| 30     | 3     | 3.6     | X                 |
| 6      | 3     | 5.0     | X                 |
| 0      | 3     | 5.5     | X                 |

**Análisis de varianza para pH obtenido después de la fermentación de *Lactobacillus rhamnosus* GG a una concentración 0.05% en el tiempo**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 23.0628           | 5  | 4.61256        | 46.13   | 0.0000  |
| Intra grupos  | 1.2               | 12 | 0.1            |         |         |
| Total (Corr.) | 24.2628           | 17 |                |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para pH obtenido después de la fermentación de *Lactobacillus rhamnosus* GG a una concentración 0.05% en el tiempo**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|--------|-------|---------|-------------------|
| 54     | 3     | 2.2     | X                 |
| 48     | 3     | 2.8     | XX                |
| 30     | 3     | 3.36667 | XX                |
| 24     | 3     | 3.73333 | X                 |
| 6      | 3     | 4.83333 | X                 |
| 0      | 3     | 5.5     | X                 |

**Análisis de varianza para pH obtenido después de la fermentación de *Lactobacillus rhamnosus* GG a una concentración 0.1% en el tiempo**

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 34.9467           | 5  | 6.98933        | 546.99  | 0.0000  |
| Intra grupos  | 0.153333          | 12 | 0.0127778      |         |         |
| Total (Corr.) | 35.1              | 17 |                |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para pH obtenido después de la fermentación de *Lactobacillus rhamnosus* GG a una concentración 0.1% en el tiempo**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|--------|-------|---------|-------------------|
| 54     | 3     | 2.2     | X                 |
| 48     | 3     | 2.2     | X                 |
| 30     | 3     | 2.8     | X                 |
| 24     | 3     | 3.63333 | X                 |
| 6      | 3     | 5.46667 | X                 |
| 0      | 3     | 5.5     | X                 |

**ANEXO 27: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL 4-METOXIBENCIL ISOTIOCIANATO PRODUCIDO POR *Lactobacillus rhamnosus* GG**

**Análisis de varianza multifactorial para el producto 4-metoxibencil isotiocianato por *Lactobacillus rhamnosus* GG**

| Fuente                      | Suma de cuadrados | Gl | Cuadrado medio | Valor-f | Valor-p |
|-----------------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| <b>EFFECTOS</b>             |                   |    |                |         |         |
| <b>PRINCIPALES</b>          |                   |    |                |         |         |
| A:                          | 938.39            | 2  | 469.194        | 927.13  | 0.000   |
| <b>CONCENTRACIÓN DE GLS</b> |                   |    |                |         |         |
| B: TIEMPO DE FERMENTACIÓN   | 63.31             | 4  | 15.827         | 31.27   | 0.000   |
| <b>INTERACCIONES</b>        |                   |    |                |         |         |
| AB                          | 63.34             | 8  | 7.918          | 15.65   | 0.000   |
| RESIDUOS                    | 15.18             | 30 | 0.506          |         |         |
| TOTAL (CORR)                | 1080.22           | 44 |                |         |         |

### **Pruebas de múltiples rangos por 4-metoxibencil isotiocianato por tiempo de fermentación**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo de fermentación | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|------------------------|-------|---------|-------------------|
| 54                     | 9     | 9.1825  | X                 |
| 24                     | 9     | 9.4896  | XX                |
| 48                     | 9     | 9.5182  | XX                |
| 30                     | 9     | 10.1631 | X                 |
| 6                      | 9     | 12.4442 | X                 |

### **Pruebas de múltiples rangos 4-metoxibencil isotiocianato por concentración de glucosinolatos concentración de glucosinolatos**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Concentración de GLS | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|----------------------|-------|---------|-------------------|
| 0.10                 | 15    | 5.8243  | X                 |
| 0.05                 | 15    | 8.1818  | X                 |
| 0.1                  | 15    | 16.4725 | X                 |

## Pruebas de múltiples rangos para 4-metoxibencil isotiocianato por interacción

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Interacción | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|-------------|-------|---------|-------------------|
| 0.01 54     | 3     | 5.5127  | X                 |
| 0.01 30     | 3     | 5.5481  | X                 |
| 0.01 24     | 3     | 5.6979  | XX                |
| 0.01 48     | 3     | 5.6997  | XX                |
| 0.01 6      | 3     | 6.6631  | XXX               |
| 0.05 54     | 3     | 7.5827  | XXX               |
| 0.05 24     | 3     | 7.7673  | XX                |
| 0.05 30     | 3     | 8.3194  | X                 |
| 0.05 48     | 3     | 8.5925  | X                 |
| 0.05 6      | 3     | 8.6469  | X                 |
| 0.10 54     | 3     | 14.4520 | X                 |
| 0.10 30     | 3     | 14.6013 | X                 |
| 0.10 24     | 3     | 15.0894 | X                 |
| 0.10 48     | 3     | 16.1973 | X                 |
| 0.10 6      | 3     | 22.0225 | X                 |

**ANEXO 28: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL 4-METOXIBENCENO ACETONITRILO PRODUCIDO POR *Lactobacillus rhamnosus* GG**

**Análisis de varianza multifactorial para el producto 4-metoxibenceno acetonitrilo por *Lactobacillus rhamnosus* GG**

| Fuente                      | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|-----------------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| <b>EFFECTOS PRINCIPALES</b> |                   |    |                |         |         |
| A: Concentración de GLS     | 4230.01           | 2  | 2115.00        | 1286.27 | 0.000   |
| B: Tiempo de fermentación   | 1169.15           | 4  | 292.29         | 177.76  | 0.000   |
| <b>INTERACCIONES</b>        |                   |    |                |         |         |
| AB                          | 789.17            | 8  | 98.65          | 59.99   | 0.000   |
| RESIDUOS                    | 49.33             | 30 | 1.64           |         |         |
| TOTAL (CORREGIDO)           | 6237.66           | 44 |                |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para 4-metoxibenceno acetonitrilo por tiempo de fermentación**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo de fermentación | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|------------------------|-------|---------|-------------------|
| 6                      | 9     | 8.19889 | X                 |
| 24                     | 9     | 14.9067 | X                 |
| 30                     | 9     | 18.1033 | X                 |
| 54                     | 9     | 24.1722 | X                 |
| 48                     | 9     | 25.5278 | X                 |

**Pruebas de múltiples rangos para 4-metoxibenceno acetonitrilo por concentración de glucosinato**

**Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD**

| Concentración de GLS | Casos | Media LS | Grupos Homogéneos |
|----------------------|-------|----------|-------------------|
| 0.01                 | 15    | 5.8382   | X                 |
| 0.05                 | 15    | 14.5272  | X                 |
| 0.1                  | 15    | 29.3236  | X                 |

**Pruebas de múltiples rangos para 4-metoxibenceno acetonitrilo por interacción**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Interacción | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|-------------|-------|---------|-------------------|
| 0.01 6      | 3     | 5.2693  | X                 |
| 0.01 30     | 3     | 5.7732  | X                 |
| 0.01 24     | 3     | 5.7929  | X                 |
| 0.01 54     | 3     | 6.1102  | X                 |
| 0.01 48     | 3     | 6.2452  | X                 |
| 0.05 6      | 3     | 7.7492  | X                 |
| 0.05 24     | 3     | 12.4101 | X                 |
| 0.10 6      | 3     | 13.0376 | X                 |
| 0.05 30     | 3     | 13.2752 | X                 |
| 0.05 48     | 3     | 17.9154 | X                 |
| 0.05 54     | 3     | 21.2863 | XX                |
| 0.10 30     | 3     | 24.7481 | XX                |
| 0.10 24     | 3     | 27.6447 | X                 |
| 0.10 54     | 3     | 40.4753 | X                 |
| 0.10 48     | 3     | 40.7124 | X                 |

**ANEXO 29: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL (4-METOXIBENCILALCOHOL) METIL ÉTER PRODUCIDO POR *Lactobacillus rhamnosus* GG**

**Análisis de varianza multifactorial para el producto (4-metoxibencilalcohol) metil éter producido por *Lactobacillus rhamnosus* GG**

| Fuente                      | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Valor-f | Valor-p |
|-----------------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| <b>EFFECTOS PRINCIPALES</b> |                   |    |                |         |         |
| A: Concentración de GLS     | 3.9641            | 1  | 3.96408        | 126.66  | 0.000   |
| B: Tiempo de fermentación   | 4.7517            | 4  | 1.18792        | 37.96   | 0.000   |
| <b>INTERACCIONES</b>        |                   |    |                |         | 0.000   |
| AB                          | 1.1611            | 4  | 0.29028        | 9.28    |         |
| RESIDUOS                    | 0.6259            | 20 | 0.03130        |         |         |
| TOTAL                       | 10.5028           | 29 |                |         |         |
| (CORREGIDO)                 |                   |    |                |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos (4-metoxibencilalcohol) metil éter producido por tiempo de fermentación**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo de fermentación | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|------------------------|-------|---------|-------------------|
| 54                     | 6     | 5.01538 | X                 |
| 48                     | 6     | 5.10534 | X                 |
| 24                     | 6     | 5.22982 | XX                |
| 30                     | 6     | 5.45696 | X                 |
| 6                      | 6     | 6.12518 | X                 |



**Pruebas de múltiples rangos para (4-metoxibencilalcohol) metil éter por concentración de glucosinolato**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Concentración de GLS | Casos | Media   | Grupos homogéneos |
|----------------------|-------|---------|-------------------|
| 0.05                 | 15    | 5.02303 | X                 |
| 0.1                  | 15    | 5.75004 | X                 |

**Pruebas de múltiples rangos para (4-metoxibencilalcohol) metil éter por interacción**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Interacción | Casos | Media   | Grupos homogéneos |
|-------------|-------|---------|-------------------|
| 0.05 54     | 3     | 4.84026 | X                 |
| 0.05 48     | 3     | 4.91420 | X                 |
| 0.05 24     | 3     | 4.94895 | XX                |
| 0.05 30     | 3     | 4.97948 | XX                |
| 0.10 54     | 3     | 5.19050 | XXX               |
| 0.10 48     | 3     | 5.29649 | XXX               |
| 0.05 6      | 3     | 5.43228 | XXX               |
| 0.10 24     | 3     | 5.51069 | XX                |
| 0.10 30     | 3     | 5.93445 | X                 |
| 0.10 6      | 3     | 6.81808 | X                 |

**ANEXO 30: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL BENCENO ACETALDEHÍDO  
PRODUCIDO POR *Lactobacillus rhamnosus* GG**

**Análisis de varianza multifactorial para el producto benceno acetaldehído producto  
de *Lactobacillus rhamnosus* GG**

| Fuente                          | Suma de<br>cuadrados | Gl | Cuadrado<br>medio | Valor-f | Valor-p |
|---------------------------------|----------------------|----|-------------------|---------|---------|
| <b>EFFECTOS</b>                 |                      |    |                   |         |         |
| <b>PRINCIPALES</b>              |                      |    |                   |         |         |
| A:                              | 23351.2              | 2  | 11675.6           | 383.59  | 0.000   |
| <b>CONCENTRACIÓN<br/>DE GLS</b> |                      |    |                   |         |         |
| B: TIEMPO DE<br>FERMENTACIÓN    | 48134.2              | 4  | 12033.5           | 395.35  | 0.000   |
| <b>INTERACCIONES</b>            |                      |    |                   |         |         |
| AB                              | 19438.6              | 8  | 2429.8            | 79.83   | 0.000   |
| RESIDUOS                        | 913.1                | 30 | 30.4              |         |         |
| TOTAL<br>(CORREGIDO)            | 91837.2              | 44 |                   |         |         |

**Pruebas de múltiples rangos para benceno acetaldehído por tiempo de fermentación**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo de fermentación | Casos | Media   | Grupos homogéneos |
|------------------------|-------|---------|-------------------|
| 6                      | 9     | 23.875  | X                 |
| 30                     | 9     | 61.393  | X                 |
| 24                     | 9     | 82.012  | X                 |
| 54                     | 9     | 100.311 | X                 |
| 48                     | 9     | 118.401 | X                 |

**Pruebas de múltiples rangos para benceno acetaldehído por concentración de glucosinolato**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Concentración de GLS | Casos | Media   | Grupos homogéneos |
|----------------------|-------|---------|-------------------|
| 0.01                 | 15    | 51.504  | X                 |
| 0.05                 | 15    | 73.217  | X                 |
| 0.1                  | 15    | 106.875 | X                 |

**Pruebas de múltiples rangos para benceno acetaldehído por interacción**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

| Interacción | Casos | Media   | Grupos homogéneos |
|-------------|-------|---------|-------------------|
| 0.05 6      | 3     | 13.801  | X                 |
| 0.01 6      | 3     | 16.909  | X                 |
| 0.10 6      | 3     | 40.916  | X                 |
| 0.01 30     | 3     | 48.360  | XX                |
| 0.01 54     | 3     | 52.886  | XXX               |
| 0.05 24     | 3     | 59.676  | XXX               |
| 0.01 48     | 3     | 64.303  | XXXX              |
| 0.05 30     | 3     | 67.794  | XXX               |
| 0.10 30     | 3     | 68.025  | XXX               |
| 0.01 24     | 3     | 75.061  | XX                |
| 0.05 54     | 3     | 77.175  | X                 |
| 0.10 24     | 3     | 111.300 | X                 |
| 0.10 48     | 3     | 143.259 | X                 |
| 0.05 48     | 3     | 147.642 | X                 |
| 0.10 54     | 3     | 170.873 | X                 |