

INFLUENCE OF SOLID-STATE BIOCONVERSION BY *Rhizopus oligosporus* ON ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHENOLIC COMPOUNDS OF MAIZE (*Zea mays* L.)

INFLUENCIA DE LA BIOCONVERSIÓN EN ESTADO SÓLIDO CON *Rhizopus oligosporus* SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE MAÍZ (*Zea mays* L.)

Luis M. Sánchez-Magaña¹, Cuauhtémoc Reyes-Moreno^{1,2}, Jorge Milán-Carrillo^{1,2}, Saraíd Mora-Rochín^{1,2}, Liliana León-López¹, Roberto Gutiérrez-Dorado^{1,2}, Edith O. Cuevas-Rodríguez^{1,2*}

¹Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB), Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), Ciudad Universitaria Culiacán, AP 354. 80000. Culiacán, Sinaloa, México. ²Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, FCQB-UAS, CU, AP 354. 80000. Culiacán, Sinaloa, México. (edith.cuevas.r@uas.edu.mx).

ABSTRACT

The total phenolic content of cereal grains is underestimated because the content of bound phenolics is often not determined. Solid-state bioconversion (SSB) of pulses and cereals has gained attention because it increases their concentration of phenolic compounds. The objective of this study was to investigate the effect of time of SSB with *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 on the total phenolic content, the phytochemical profile in free and bound form, and antioxidant activity of maize grains. Cooked maize grains were inoculated with a suspension of *R. oligosporus* NRRL 2710 and incubated at 35 °C for 0, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 and 108 h. All treatments were performed in triplicate. Free and bound phenolic extracts were utilized to determine total phenolic content (TPC), antioxidant activity (AoxA), and the phenolic acid profile (PAP) in raw and bioprocessed maize. A one-way analysis of variance was performed with the data and means were compared using Tukey test ($p \leq 0.05$). SSB of maize increased TPC by 45 %, and AoxA by 1.5- and 2.3-fold compared to raw maize as estimated by oxygen-radical absorbance capacity (ORAC) and ABTS assay respectively. Regardless of the method used to assess AoxA, a significant correlation was found between TPC and AoxA. Additionally, SSB increased the content of free and bound phenolic acids of maize. Thus, because of its superior antioxidant properties, bioprocessed maize should be considered as a functional food for the prevention of oxidative stress-related diseases.

Keywords: Maize, solid-state bioconversion, phenolic acids,

RESUMEN

El contenido fenólico total de los granos de cereal se subestima porque, a menudo, no se determina el contenido de fenólicos ligados. La bioconversión en estado sólido (SSB) de legumbres y cereales ha ganado atención porque aumenta su concentración de compuestos fenólicos. El objetivo de este estudio fue investigar el efecto del tiempo de SSB con *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 sobre el contenido fenólico total de los granos de maíz, su perfil fitoquímico en forma libre y ligada y su actividad antioxidante. Los granos de maíz cocidos se inocularon con una suspensión de *R. oligosporus* NRRL 2710 y se incubaron a 35 °C durante 0, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 y 108 h. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Extractos fenólicos libres y ligados se usaron para determinar el contenido fenólico total (TPC), la actividad antioxidante (AoxA) y el perfil de ácidos fenólicos (PAP) en maíz crudo y bioprocesado. Con los datos se realizó a un análisis de varianza de una vía y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). La SSB del maíz incrementó el TPC en 45 % y la AoxA 1.5 y 2.3 veces en comparación con el maíz crudo, según lo estimado por la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y el ensayo ABTS, respectivamente. Sin importar el método utilizado para evaluar la AoxA, se encontró una correlación significativa entre el TPC y la AoxA. Además, la SSB aumentó el contenido de ácidos fenólicos libres y ligados del maíz. Por lo tanto, debido a sus propiedades antioxidantes superiores, el maíz bioprocesado debe considerarse un alimento funcional para la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

*Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: octubre, 2017. Aprobado: marzo, 2018.

Publicado como ARTÍCULO en Agrocencia 53: 45-57. 2019.

Palabras clave: maíz, bioconversión en estado sólido, ácidos fenólicos, antioxidantes.

antioxidants.

INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) is one of the most important cereals in the world, and its consumption is associated with beneficial effects due to the antioxidant activity attributed to this grain (Zhao *et al.*, 2005). Pozo-Insfran *et al.* (2006) and Salar *et al.* (2012) reported that maize phenolic compounds are powerful antioxidants that exert their actions through radical scavenging. Because of their properties, foods rich in phenolic compounds are considered nutraceuticals. Grain phytochemicals may exist in free, soluble conjugate, and insoluble-bound forms (Adom and Liu, 2002). About 85 % of the total phenolics in maize are in insoluble-bound forms, and ferulic acid is the major phenolic compound of this category (Adom and Liu, 2002).

Phenolic levels of grains were determined using various aqueous solutions such as methanol, ethanol, and acetone to extract soluble phenolics (Randhir *et al.*, 2004; Randhir and Shetty, 2007; Bhanja and Kuhad 2014; Schmidt *et al.*, 2014). These studies used long extraction times and finely powdered samples to ensure maximum extraction of phenolic compounds from grains. However, by utilizing only organic solvents, without acid/base hydrolysis, the extraction of most insoluble bound phenolics is difficult (Bhanja and Kuhad, 2014). Therefore, the total phenolic content of cereal grains is underestimated because the content of bound phenolic is often not determined (Adom and Liu, 2002). In order to obtain the maximum yield of phenolic acids, a hydrolysis process must be used (Wojdylo and Oszmański, 2007). However, chemical hydrolysis processes may lead to degradation of certain phenolic acids (Demirbas, 2005), while the enzymatic hydrolysis is not considered cost effective because commercial enzymes are expensive (Bhanja *et al.*, 2009).

An alternative way to increase the phenolic content of pulses and cereals is to use the solid-state bioconversion (SSB) process (Randhir and Shetty, 2007; Salar *et al.*, 2012; Bhanja and Kuhad 2014; Schmidt *et al.*, 2014). SSB is the microbial bioprocessing of a solid substrate that acts as a physical support and source of nutrients in the presence of low free liquid (Randhir and Shetty, 2007). This bioprocess requires a relatively simple infrastructure and could be an appropriate method for small- and

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cereales más importantes en el mundo y su consumo está asociado con efectos benéficos gracias a la actividad antioxidante que se le atribuye (Zhao *et al.*, 2005). Pozo-Insfran *et al.* (2006) y Salar *et al.* (2012) informaron que los compuestos fenólicos del maíz son poderosos antioxidantes que ejercen sus acciones a través del secuestro de radicales libres. Gracias a sus propiedades, los alimentos ricos en compuestos fenólicos se consideran nutraceuticos. Los fitoquímicos de los granos pueden existir en forma libre, soluble conjugada y ligada insoluble (Adom y Liu, 2002). Alrededor del 85 % de los fenólicos totales en el maíz están en forma ligada insoluble, y el ácido ferúlico es el principal compuesto fenólico de esta categoría (Adom y Liu, 2002).

Los niveles fenólicos de los granos se determinaron usando varias soluciones acuosas (metanol, etanol y acetona) para extraer los fenólicos solubles (Randhir *et al.*, 2004; Randhir y Shetty, 2007; Bhanja y Kuhad, 2014; Schmidt *et al.*, 2014). Estas investigaciones usaron largos tiempos de extracción y muestras finamente pulverizadas para asegurar la máxima extracción de compuestos fenólicos de los granos. Sin embargo, al utilizar solo solventes orgánicos, sin hidrólisis ácida/básica, es difícil extraer la mayoría de los fenólicos ligados insolubles (Bhanja y Kuhad, 2014). Por lo tanto, el contenido fenólico total de los granos de cereales se subestima porque a menudo no se determina el contenido de fenólicos ligados (Adom y Liu, 2002). Para obtener el máximo rendimiento de ácidos fenólicos, se debe usar un proceso de hidrólisis (Wojdylo y Oszmański, 2007). Sin embargo, los procesos de hidrólisis química pueden conducir a la degradación de ciertos ácidos fenólicos (Demirbas, 2005), mientras que la hidrólisis enzimática no se considera rentable porque las enzimas comerciales son caras (Bhanja *et al.*, 2009).

Una forma alternativa para incrementar el contenido fenólico de legumbres y cereales es utilizar el proceso de bioconversión en estado sólido (SSB) (Randhir y Shetty, 2007; Salar *et al.*, 2012; Bhanja y Kuhad, 2014; Schmidt *et al.*, 2014). La SSB es el bioprocésamiento microbiano de un sustrato sólido que actúa como una base física y fuente de nutrientes en presencia reducida de líquido libre (Randhir y Shetty, 2007). Este bioproceso requiere una infraestructura relativamente simple y puede ser un método

medium-scale processing of locally available grains into wholesome products of high nutritional value in developing countries. Tempeh is a nutritious oriental fermented food produced by SSB of soybeans with a food-grade fungus, *Rhizopus oligosporus*. SSB also can be used to improve the nutritional value and antioxidant capacity of other grains including maize (Reyes-Moreno *et al.*, 2004; Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2006). However, changes on total phenolic content, antioxidant capacity and the profile of free and bound phenolic compounds induced by SSB on this cereal remains unclear. The objective of this study was to investigate the effect of time of SSB with *R. oligosporus* NRRL 2710 on the total phenolic content, the phytochemical profile in free and bound form, and antioxidant activity of maize grains. The SSB of maize using longer rather than shorter fermentation time periods would increase phenolic compounds and, therefore, a greater antioxidant activity in the grains.

MATERIALS AND METHODS

Raw materials, reagents and standards

Maize (var Pioneer DK538) was cultivated at the Culiacan Valley Experimental Station of the National Research Institute for Forestry, Agriculture, and Livestock (INIFAP), Sinaloa, México. Grains were harvested, cleaned, and stored at 4 °C in tightly sealed containers until use. The *R. oligosporus* NRRL 2710 strain was obtained from the American Type Culture Collection, Manassas, USA. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, di-potassium peroxodisulfate, PBS (phosphate buffered saline), (+)-catechin hydrate, gallic acid, Trolox, HCl, ethanol, and Folin-Ciocalteu reagent were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals (St Louis, MO, USA). All other chemicals and reagents were analytical grade.

Production of bioprocessed maize flour (BMF)

Bioprocessed maize was prepared using the SSB procedure described by Reyes-Moreno *et al.* (2004) with minor modifications. Maize grains were fragmented and then soaked at 25 °C for 16 h in acetic acid solution (pH 3.0). Soaked grains were then drained and cooked in acetic acid solution (pH 3.0) at 90 °C for 30 min, cooled at 25 °C for 3 h, inoculated with a suspension of *R. oligosporus* NRRL 2710 (1×10^6 spores mL⁻¹), and packed in polyethylene bags (15 × 15 cm) with perforations of 0.1 mm every 4 cm. Solid-state bioconversion (SSB) was

apropiado para el procesamiento (a pequeña y mediana escala) de granos disponibles de forma local en productos saludables de alto valor nutricional, en países en desarrollo. El tempeh es un alimento fermentado oriental nutritivo producido mediante la SSB de soya con un hongo de grado alimenticio, *Rhizopus oligosporus*. La SSB también se puede usar para mejorar el valor nutricional y la capacidad antioxidante de otros granos incluyendo el maíz (Reyes-Moreno *et al.*, 2004; Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2006). Sin embargo, en este cereal, los cambios en el contenido fenólico total, la capacidad antioxidante y el perfil de compuestos fenólicos libres y ligados inducidos por la SSB no son claros. El objetivo de este estudio fue investigar el efecto del tiempo de la SSB con *R. oligosporus* NRRL 2710 sobre el contenido fenólico total, el perfil fitoquímico en forma libre y ligada y la actividad antioxidante de los granos de maíz. La SSB del maíz usando periodos de fermentación más largos en vez de más cortos aumentaría los compuestos fenólicos y, por lo tanto, una mayor actividad antioxidante en los granos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materias primas, reactivos y estándares

El maíz (var Pioneer DK538) se cultivó en el Campo Experimental Valle de Culiacán del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Sinaloa, México. Los granos se cosecharon, limpiaron y almacenaron a 4 °C en contenedores herméticamente cerrados hasta su uso. La cepa *R. oligosporus* NRRL 2710 se obtuvo de la American Type Culture Collection, Manassas, USA. El DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido, ABTS [Sal de diamonio del 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)], persulfato de potasio, PBS (tampón fosfato salino), (+)-hidrato de catequina, ácido gálico, Trolox, HCl, etanol y el reactivo Folin-Ciocalteu se adquirieron en Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA). Todos los otros químicos y reactivos fueron de grado analítico.

Producción de harina de maíz bioprocesado (BMF)

El maíz bioprocesado se preparó con el procedimiento de SSB descrito por Reyes-Moreno *et al.* (2004) con modificaciones menores. Los granos de maíz se fragmentaron y remojaron en una solución de ácido acético (pH 3.0) a 25 °C por 16 h. Después se escurrieron; se cocieron en una solución de ácido acético (pH 3.0) a 90 °C por 30 min; se enfriaron a 25 °C por 3 h; se inocularon con una suspensión de *R. oligosporus* NRRL

performed at 35 °C and fermentation times of 0, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 and 108 h. The resulting bioprocessed maize grains were dried (50 °C, 8 h) to obtain a moisture content of 8 % ($a_w=0.5$), cooled (25 °C) and milled (80-US mesh=0.180 mm). Bioprocessed maize flours (BMF) from each fermentation time were packed and kept at -40 °C in tightly sealed containers until use.

Extraction of free phenolic compounds

Free phenolic compounds in ground samples were extracted as reported by Dewanto *et al.* (2002) with some modifications. Briefly, 1 g of ground sample was blended with 10 mL of chilled ethanol at 80 % for 10 min, and then centrifuged at 2500 xg for 10 min. The supernatant was concentrated under vacuum at 45 °C. The resulting extracts were stored at -40 °C until evaluation.

Extraction of bound phenolic compounds

Bound phenolic compounds in ground samples were extracted using the method reported by Mora-Rochin *et al.* (2010). After extraction of free phenolic compounds, the residue was digested with sodium hydroxide (2 M, 95 °C / 30 min). Finally, the sample was agitated for 1 h at 25 °C. The mixture was acidified (pH <2.0) and extracted with hexane. The final solution was extracted with ethyl acetate and evaporated to dryness under vacuum at 35 °C. Bound phenolic compounds were reconstituted with methanol-water (50:50, v/v) and stored at -40 °C until evaluation.

Total phenolic content (TPC)

The content of free and bound phenolic compounds was determined using the colorimetric method described by Singleton *et al.* (1999) in 20 μ L of extracts using Folin-Ciocalteu reagent in a Microplate Reader (Synergy™ Multi-Detection, BioTek, Inc, Winooski, VT, USA). A calibration curve was prepared using gallic acid as a standard, and total phenolics were expressed as milligrams of gallic acid equivalents (mgGAE) 100 g⁻¹ of dry weight (dw) of sample.

Separation and identification of phenolic acids

Phenolic acid separation and identification was carried out using the protocol reported by Mora-Rochin *et al.* (2010). Briefly, free and bound extracts of ground samples were used to analyze the phenolic compounds using HPLC (Perkin Elmer series 1100, Inc, Germany) equipped with an YMC-Pack ODS-AM-303 column (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) and a UV-visible detector. Isocratic

2710 (1×10⁶ esporas mL⁻¹), y se empacaron en bolsas de polietileno (15×15 cm) con perforaciones de 0.1 mm cada 4 cm. La bioconversión en estado sólido (SSB) se realizó a 35 °C y los tiempos de fermentación fueron 0, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 y 108 h. Los granos de maíz bioprocesados resultantes se secaron (50 °C, 8 h) para obtener un contenido de humedad del 8 % ($a_w=0.5$), se enfriaron (25 °C) y molieron (80-US malla=0.180 mm). Las harinas de maíz bioprocesado (BMF) de cada tiempo de fermentación se empacaron y mantuvieron a -40 °C en recipientes herméticamente cerrados hasta su uso.

Extracción de compuestos fenólicos libres

Los compuestos fenólicos libres en muestras molidas se extrajeron como indicaron Dewanto *et al.* (2002), con algunas modificaciones. En resumen: 1 g de muestra molida se mezcló con 10 mL de etanol frío al 80 % por 10 min y luego se centrifugó a 2500 xg por 10 min. El sobrenadante se concentró bajo vacío a 45 °C. Los extractos resultantes se almacenaron a -40 °C hasta la evaluación.

Extracción de compuestos fenólicos ligados

Los compuestos fenólicos ligados en muestras molidas se extrajeron usando el método reportado por Mora-Rochin *et al.* (2010). Después de la extracción de compuestos fenólicos libres, el residuo se digirió con hidróxido de sodio (2 M, 95 °C/30 min). Luego, la muestra se agitó 1 h a 25 °C. La mezcla se acidificó (pH <2.0) y se extrajo con hexano. La solución final se extrajo con acetato de etilo y se evaporó a sequedad bajo vacío a 35 °C. Los compuestos fenólicos ligados se reconstituyeron con metanol:agua (50:50, v/v) y se almacenaron a -40 °C hasta la evaluación.

Contenido fenólico total (TPC)

El contenido de compuestos fenólicos libres y ligados se determinó usando el método colorimétrico descrito por Singleton *et al.* (1999) en 20 μ L de extractos con el reactivo Folin-Ciocalteu en un lector de microplacas Microplate Reader (Synergy™ Multi-Detection, BioTek, Inc, Winooski, VT, USA). Una curva de calibración se preparó con ácido gálico como estándar. Los fenólicos totales se expresaron como miligramos de equivalentes de ácido gálico (mg GAE) 100 g⁻¹ de muestra en base seca (dw).

Separación e identificación de ácidos fenólicos

La separación e identificación de los ácidos fenólicos se realiza con el protocolo de Mora-Rochin *et al.* (2010). En resumen: se

elution was conducted with acetonitrile:water (20:80), pH 2 with trifluoroacetic acid, at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} and 25°C of column temperature. The injection volume was $20 \mu\text{L}$ and the total run time was 40 min. Detection and quantification of each compound in sample extracts were established by comparing retention times, UV spectra at 320 nm for *p*-coumaric, ferulic and sinapic acids while *p*-hydroxybenzoic acid was detected at 260 nm. Detector signals were acquired and integrated into Chromera Software (Perkin Elmer Inc., Germany). The identity with those of standards and their concentrations were calculated by the standard curve.

Antioxidant activity (AoxA)

Oxygen-radical absorbance capacity (ORAC) assay

Free and bound hydrophilic antioxidant capacities were determined using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. Extracts were evaluated against a standard of Trolox with fluorescein as a probe, as described by Ou *et al.* (2001). Peroxyl radicals were generated by 2,2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride, and fluorescent loss was monitored in a Microplate Reader (Synergy™ HT Multi-Detection, BioTek, Inc., Winooski, VT, USA). The absorbance of excitation and emission was set at 485 and 538 nm, respectively. Data were expressed as micromoles of Trolox equivalents (TE) per 100 g of dw sample.

ABTS radical cation decolorization assay

ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenthiazoline-6-sulfonic acid)] can stabilize free radicals into their non-radical decolorized form when reacting with antioxidants. The method for determining ABTS radical scavenging activity was modified from Re *et al.* (1999). Briefly, ABTS radical cation ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) was generated by oxidation of 7 mM ABTS with 2.45 mM potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) and stored in a dark place at room temperature for 12-16 h. The $\text{ABTS}^{\bullet+}$ stock solution was diluted with PBS (pH 7.4) to an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm for measurement and equilibrated at 30°C . After addition of $10 \mu\text{L}$ of extracts to 2.99 mL of diluted $\text{ABTS}^{\bullet+}$ solution ($A = 0.700 \pm 0.020$), the absorbance was measured at 734 nm exactly 6 min after initial mixing. The results were expressed as μmol Trolox equivalent (TE) 100 g^{-1} of dw of sample.

Experimental design and statistical analysis

In order to evaluate the effect of SSB on TPC and AoxA the experimental design was unifactorial completely randomized and

usaron extractos libres y ligados de muestras molidas para analizar los compuestos fenólicos mediante un HPLC (Perkin Elmer series 1100, Inc., Alemania) equipado con una columna YMC-Pack ODS-AM-303 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) y un detector de UV-visibles. La elución isocrática se condujo con acetonitrilo:agua (20:80), pH 2 con ácido trifluoroacético, a una velocidad de flujo de 0.5 mL min^{-1} y una temperatura de columna de 25°C . El volumen de inyección fue $20 \mu\text{L}$ y el tiempo de ejecución total fue 40 min. La detección y cuantificación de cada compuesto en extractos de muestra se establecieron al comparar tiempos de retención, espectros UV a 320 nm para ácidos *p*-cumárico, ferúlico y sinápico, y a 260 nm para ácido *p*-hidroxibenzoico. Las señales del detector se obtuvieron e integraron en el Chromera Software (Perkin Elmer Inc., Alemania). La identidad con los de los estándares y sus concentraciones se calcularon mediante la curva estándar.

Actividad antioxidante (AoxA)

Prueba de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

Las capacidades antioxidantes hidrofílicas libres y ligadas se determinaron usando la prueba de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC). Los extractos se evaluaron contra un estándar de Trolox con fluoresceína como sonda, según Ou *et al.* (2001). Los radicales de peróxido se generaron por 2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro y la pérdida de fluorescencia se monitoreó en un lector de microplacas Microplate Reader (Synergy™ HT Multi-Detection, BioTek, Inc., Winooski, VT, USA). La absorción de la excitación y emisión se establecieron a 485 y 538 nm, respectivamente. Los datos se expresaron como micromoles de equivalentes de Trolox (TE) por 100 g^{-1} de muestra en base seca (dw).

Prueba de decoloración del catión radical ABTS

El ABTS [2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbentotiazolin-6-sulfónico)] puede estabilizar los radicales libres en su forma no radical decolorada cuando reacciona con antioxidantes. El método para determinar la actividad secuestrante de radicales ABTS se modificó de Re *et al.* (1999). En resumen: el catión radical ABTS ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) se generó por oxidación de 7 mM de ABTS con 2.45 mM de persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) y se guardó 12-16 h en un lugar oscuro a temperatura ambiente. La solución $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se diluyó con PBS (pH 7.4) para una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 734 nm para medición y se equilibró a 30°C . Tras añadir $10 \mu\text{L}$ de extractos a 2.99 mL de solución $\text{ABTS}^{\bullet+}$ diluida ($A = 0.700 \pm 0.020$), se midió la absorción a 734 nm exactamente 6 min después de la mezcla

the factor was time of fermentation with nine levels: 0, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 and 108 h. The effect of SSB on profile of phenolic acids was evaluated with an unifactorial experimental design and the factor was type of sample: raw, cooked and fermented 108 h. With the data one way ANOVA was performed and means were compared with Tukey test ($p \leq 0.05$). The Pearson correlation was used to carry out a correlation analysis between TPC and AoxA. The statistical analyses were performed with Statgraphics Centurion XV software (Stat Point Technologies Inc., Warrenton, VA, USA). All treatments were carried out by triplicate and values are shown as mean $\pm$ standard deviation (SD).

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of solid-state bioconversion time on total phenolic content (TPC)

The TPC of unfermented and fermented maize flours was evaluated in free, bound and total extracts (Table 1). The solid-state bioconversion (SSB) increased free and total phenolic contents of maize at all incubation times ($p \leq 0.05$).

Bound phenolic content significantly increased ($p \leq 0.05$) after 60 h of fermentation. The best time for producing bioprocessed maize flour with the highest free (228 mg GAE 100 g⁻¹ sample), bound (766 mg GAE 100 g⁻¹ sample) and total phenolic (993 mg GAE 100 g⁻¹ sample, dw) contents was 108 h. The bioprocessed maize grains exhibited undesirable odor and appearance with incubation

inicial. Los resultados se expresaron como μmol de equivalentes de Trolox (TE) 100 g⁻¹ de muestra (dw).

Diseño experimental y análisis estadístico

Para evaluar el efecto de la SSB sobre TPC y AoxA el diseño experimental fue unifactorial completamente al azar y el factor fue el tiempo de fermentación con nueve niveles: 0, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 y 108 h. El efecto de la SSB sobre el perfil de ácidos fenólicos se evaluó con un diseño experimental unifactorial y el factor fue el tipo de muestra: crudo, cocido y fermentado 108 h. Con los datos se realizó un ANDEVA de una sola vía y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). La correlación de Pearson se usó para efectuar un análisis de correlación entre TPC y AoxA. El análisis estadístico se realizó en el software Statgraphics Centurion XV (Stat Point Technologies Inc., Warrenton, VA, USA). Todos los tratamientos se efectuaron por triplicado y los valores se expresaron como la media $\pm$ desviación estándar (SD).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tiempo de bioconversión en estado sólido sobre el contenido fenólico total (TPC)

El TPC de harinas de maíz no fermentado y fermentado se evaluó en extractos libres, ligados y totales (Cuadro 1). La bioconversión en estado sólido (SSB) aumentó los contenidos fenólicos libres y totales del maíz en todos los tiempos de incubación ($p \leq 0.05$).

Table 1. Effect of SSB time on total phenolic content in maize flours.

Cuadro 1. Efecto del tiempo de SSB sobre el contenido fenólico total en harinas de maíz.

Fermentation time (h)	Phenolic compounds (mg equivalents of gallic acid 100 ⁻¹ g sample, dw)		
	Free	Bound	Total
Raw	85.73 $\pm$ 1.33 ^E	600.12 $\pm$ 11.10 ^{CD}	685.85 $\pm$ 12.43 ^C
Cooked	43.78 $\pm$ 0.61 ^G	587.54 $\pm$ 30.57 ^D	631.32 $\pm$ 30.26 ^D
Bioprocessed			
24	48.85 $\pm$ 1.06 ^G	630.92 $\pm$ 17.33 ^C	679.77 $\pm$ 17.70 ^C
36	74.37 $\pm$ 1.02 ^F	601.01 $\pm$ 55.74 ^{CD}	675.38 $\pm$ 55.39 ^C
48	96.99 $\pm$ 2.04 ^D	581.72 $\pm$ 76.10 ^D	678.72 $\pm$ 77.97 ^C
60	146.61 $\pm$ 6.03 ^C	580.75 $\pm$ 17.72 ^D	727.35 $\pm$ 14.90 ^C
72	155.39 $\pm$ 5.08 ^C	724.01 $\pm$ 47.93 ^{AB}	879.40 $\pm$ 46.77 ^A
84	165.17 $\pm$ 3.80 ^B	703.48 $\pm$ 79.51 ^{AB}	868.66 $\pm$ 81.95 ^A
96	217.47 $\pm$ 3.20 ^A	679.67 $\pm$ 32.91 ^B	897.14 $\pm$ 32.10 ^A
108	227.75 $\pm$ 6.65 ^A	765.69 $\pm$ 33.54 ^A	993.44 $\pm$ 36.61 ^A

^{A-B} Means with different superscripts in a column are significantly different ($p \leq 0.05$). Data are expressed as means $\pm$ SD. ^{A-B} Medias con superíndices diferentes en una columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$). Los datos se expresan como medias $\pm$ SD.

times higher than 108 h. The SSB processed for 108 h increased by 1.5-fold the TPC (from 685 to 993 mg GAE 100 g⁻¹ sample dw; $p \leq 0.05$).

The increase of TPC in bioprocessed maize flour after 108 h of fermentation in our study was consistent with the findings reported by Salar *et al.* (2012), who used a filamentous fungus, *Thamnidium elegans* CCF 1456, to bioprocess maize and observed that TPC was significantly higher than those in unfermented maize. Maiti and Majumdar (2012), Sousa and Correia (2012), Bhanja and Kuhad (2014) and Schmidt *et al.* (2014) used filamentous fungi to enhance the phenolic content of various food crops using SSB. Several phenolic compounds found in plants exist in conjugated forms either with sugars as glycosides or other moieties (Vattem and Shetty, 2002). Bhanja *et al.* (2009) reported the role of hydrolytic enzymes in the release of bound polyphenolic compounds and the increase of total phenolic content in wheat koji. Maiti and Majumdar (2012) suggested that the β -glucosidase, produced by fungi, catalyzes the release of aglycones from the substrate and, therefore, increases its TPC. Also, Salar *et al.* (2012) confirmed the role of some enzymes (α -amylase, β -glucosidase, xylanase) in mobilizing phenolic compounds of maize fermented with *Thamnidium elegans*. Nevertheless, it is important to consider that several factors might affect the TPC in cereals, such as grain variety, cultivation characteristics, chemical composition, particle size, sample concentration and the method of analysis (Naczek and Shahidi, 2006).

Effect of solid-state bioconversion (SSB) time on antioxidant activity (AoxA)

Regardless of the method used, the AoxA of bioprocessed maize flours increased with the time of fermentation until 84 h; afterwards, no further increments were observed (Table 2). ORAC values for total phytochemicals from bioprocessed maize flours were different ($p \leq 0.05$) at 0, 24, 36, 48, and 84 h of incubation time, but at 84, 96, and 108 h there were no differences in antioxidant activity. After 108 h of incubation, the bioprocessed maize presented undesirable odor; therefore, longer time-points were not considered in our study. The AoxA, evaluated by the ABTS method for free, bound, and total phytochemicals in unfermented and bioprocessed maize (incubation time = 108 h) are shown in Table 2.

El contenido fenólico ligado aumentó significativamente ($p \leq 0.05$) después de 60 h de fermentación. El tiempo de 108 h es el mejor para producir harina de maíz bioprocesado con el mayor contenido fenólico libre (228 mg GAE 100 g⁻¹ de muestra), ligado (766 mg GAE 100 g⁻¹ de muestra) y total (993 mg GAE 100 g⁻¹ de muestra dw). Con tiempos de incubación superiores a 108 h, los granos de maíz bioprocesados presentaron olor y apariencia indeseable. La SSB procesada 108 h aumentó 1.5 veces el TPC (de 685 a 993 mg GAE 100 g⁻¹ de muestra dw; $p \leq 0.05$).

El aumento del TPC en harina de maíz bioprocesado después de 108 h de fermentación en nuestro estudio fue consistente con los hallazgos informados por Salar *et al.* (2012), quienes usaron un hongo filamentoso, *Thamnidium elegans* CCF 1456, para bioprocasar maíz y observaron que el TPC era significativamente más alto que en el maíz sin fermentar. Maiti y Majumdar (2012), Sousa y Correia (2012), Bhanja y Kuhad (2014) y Schmidt *et al.* (2014) usaron hongos filamentosos para mejorar el contenido fenólico de varios cultivos alimenticios usando SSB. Varios compuestos fenólicos en las plantas existen en formas conjugadas con azúcares como glucósidos u otras moléculas (Vattem y Shetty, 2002). Bhanja *et al.* (2009) informaron el rol de las enzimas hidrolíticas en la liberación de compuestos polifenólicos ligados y en el aumento del contenido fenólico total en el koji de trigo. Maiti y Majumdar (2012) sugirieron que la β -glucosidasa, producida por hongos, cataliza la liberación de agliconas del sustrato y, por lo tanto, aumenta su TPC. Además, Salar *et al.* (2012) confirmaron el rol de algunas enzimas (α -amilasa, β -glucosidasa, xilanasa) en la movilización de compuestos fenólicos de maíz fermentado con *Thamnidium elegans*. Sin embargo, es importante considerar que varios factores podrían afectar el TPC en cereales, como la variedad de grano, características de cultivo, composición química, tamaño de la partícula, concentración de la muestra y método de análisis (Naczek y Shahidi, 2006).

Efecto del tiempo de bioconversión en estado sólido (SSB) sobre la actividad antioxidante (AoxA)

Sin importar el método utilizado, la AoxA de las harinas de maíz bioprocesado aumentó con el tiempo de fermentación hasta 84 h; después, no se observaron

Table 2. Effect of SSB time on antioxidant activity of maize evaluated by ORAC and ABTS assays.**Cuadro 2. Efecto del tiempo de SSB sobre la actividad antioxidante evaluada con las pruebas ORAC y ABTS.**

Fermentation time (h)	Antioxidant activity [†] ($\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1} \text{ sample, dw}$)					
	ORAC			ABTS		
	Free	Bound	Total	Free	Bound	Total
Raw	3714 $\pm$ 72 ^E	10 082 $\pm$ 404 ^C	13 796 $\pm$ 476 ^{D,E}	1008 $\pm$ 150 ^G	3304 $\pm$ 261 ^{C,D}	4312 $\pm$ 419 ^F
Cooked	3445 $\pm$ 67 ^F	8612 $\pm$ 26 ^D	12 058 $\pm$ 83 ^F	303 $\pm$ 50 ^H	3601 $\pm$ 183 ^C	3904 $\pm$ 226 ^G
Bioprocessed						
24	3507 $\pm$ 36 ^F	9663 $\pm$ 246 ^C	13 170 $\pm$ 253 ^E	270 $\pm$ 33 ^H	3367 $\pm$ 82 ^C	3637 $\pm$ 64 ^G
36	3519 $\pm$ 112 ^{E,F}	10 477 $\pm$ 517 ^{B,C}	14 056 $\pm$ 544 ^{D,E}	907 $\pm$ 84 ^G	3008 $\pm$ 318 ^D	3915 $\pm$ 280 ^{E,G}
48	3897 $\pm$ 93 ^D	10 909 $\pm$ 493 ^{B,C}	14 807 $\pm$ 524 ^D	1832 $\pm$ 74 ^F	3295 $\pm$ 110 ^{C,D}	5127 $\pm$ 36 ^E
60	5180 $\pm$ 20 ^C	11 427 $\pm$ 559 ^B	16 607 $\pm$ 568 ^C	3274 $\pm$ 136 ^E	3514 $\pm$ 226 ^C	6788 $\pm$ 359 ^D
72	5708 $\pm$ 87 ^B	13 331 $\pm$ 447 ^A	19 083 $\pm$ 498 ^B	4039 $\pm$ 191 ^D	4331 $\pm$ 136 ^A	8370 $\pm$ 145 ^C
84	7469 $\pm$ 180 ^A	12 790 $\pm$ 503 ^A	20 259 $\pm$ 573 ^{A,B}	4456 $\pm$ 131 ^C	4058 $\pm$ 75 ^{A,B}	8514 $\pm$ 117 ^C
96	7316 $\pm$ 70 ^A	12 676 $\pm$ 579 ^A	19 993 $\pm$ 646 ^{A,B}	5228 $\pm$ 255 ^B	4164 $\pm$ 175 ^{A,B}	9392 $\pm$ 85 ^B
108	7445 $\pm$ 127 ^A	12 976 $\pm$ 521 ^A	20 422 $\pm$ 479 ^A	6080 $\pm$ 261 ^A	3961 $\pm$ 85 ^B	10 041 $\pm$ 231 ^A

^{A-B} Means with different superscripts in a column are statistically different ($p \leq 0.05$); [†]Data are expressed as means $\pm$ SD. ♦ Medias

^{A-B} con superíndices diferentes en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). [†]Los datos se expresan como medias $\pm$ SD.

The highest AoxA of bioprocessed maize flour was achieved after fermenting for 108 h. Both, ORAC and ABTS methods, showed similar results. SSB could be a good strategy to produce cereal-based foods with high AoxA. Our results agree with those reported by other researchers (Reyes-Bastidas *et al.*, 2010; Maiti and Majumdar, 2012; Salar *et al.*, 2012; Guzmán-Urriarte *et al.*, 2013; Sánchez-Magaña *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2014).

Correlation between total phenolic content and antioxidant activity

Significant correlations between TPC and AoxA were found regardless of the method used to determine AoxA. There was a significant correlation (Table 3) between TPC and total hydrophilic antioxidant activity (ORAC value) in bioprocessed maize flours ($r=0.95$; $p=0.005$). This linear correlation is extremely significant due to the high coefficient of determination ($r^2=0.88$). Similar results were observed between TPC and antioxidant activity assayed by the ABTS method ($r^2=0.92$, $r=0.96$; $p=0.001$).

Our data are consistent with those of Segev *et al.* (2010), Yao *et al.* (2011) and Guzmán-Urriarte *et al.* (2013), who reported highly significant correlations

incrementos adicionales (Cuadro 2). Los valores de ORAC para los fitoquímicos totales de harinas de maíz bioprocesado fueron diferentes ($p \leq 0.05$) en 0, 24, 36, 48 y 84 h de tiempo de incubación, pero en 84, 96 y 108 h no hubo diferencias en la actividad antioxidante. Después de 108 h de incubación, el maíz bioprocesado presentó olor desagradable; por lo tanto, no se consideraron tiempos más largos en nuestro estudio. En el Cuadro 2 se muestra la AoxA evaluada por el método ABTS para fitoquímicos libres,

Table 3. Correlation coefficient analysis of total phenolic compounds and total hydrophilic antioxidant activity in bioprocessed maize flours.**Cuadro 3. Análisis del coeficiente de correlación de los compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante hidrofílica total en harinas de maíz bioprocesado.**

Phenolic compounds	Antioxidant activity	
	ABTS	ORAC
Free	0.99**	0.95**
Bound	0.81*	0.80*
Total	0.96**	0.95**

Pearson's correlation coefficients in a column: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$. ♦ Coeficientes de correlación de Pearson en una columna: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$.

between TPC and AoxA in whole raw legume seeds. Phenolic compounds are the major phytochemicals compounds contributing to the total antioxidant activity of grains (Yao *et al.*, 2010). The presence of these compounds in grains is associated with a reduced risk of cancer heart disease, and diabetes. Also, antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, and anti-allergenic properties are attributed to phenolics. Most of the health benefits could be a result of their antioxidant activity (Randhir and Shetty, 2007).

Effect of solid-state bioconversion on phenolic acid profile of maize grains

Four major phenolic acids were identified in the free and bound forms in maize grains: ferulic, *p*-coumaric, sinapic, and *p*-hydroxybenzoic acid (Table 4). Our results show that in cooked and bioprocessed maize, ferulic acid was the predominant phenolic acid present (46-49 %) followed by sinapic (25-33%), *p*-coumaric (15-28%), and *p*-hydroxybenzoic (0.2-2 %) acids. Regarding the free fractions of raw maize, sinapic (54 %) and ferulic acids (33 %) were the major phenolic acids present. Likewise, our results

ligados y totales en maíz sin fermentar y bioprocesado (tiempo de incubación=108 h).

La mayor AoxA de harina de maíz bioprocesado se logró después de fermentar durante 108 h. Ambos métodos, ORAC y ABTS, mostraron resultados similares. La SSB podría ser una buena estrategia para producir alimentos a base de cereales con alta AoxA. Nuestros resultados concuerdan con los informados por otros investigadores (Reyes-Bastidas *et al.*, 2010; Maiti y Majumdar, 2012; Salar *et al.*, 2012; Guzmán-Uriarte *et al.*, 2013; Sánchez-Magaña *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2014).

Correlación entre el contenido fenólico total y la actividad antioxidante

Correlaciones significativas se encontraron entre el TPC y la AoxA sin importar el método usado para determinar la AoxA. Hubo una correlación significativa (Cuadro 3) entre el TPC y la actividad antioxidante hidrofílica total (valor ORAC) en harinas de maíz bioprocesado ($r=0.95$; $p=0.005$). Esta correlación lineal es extremadamente significativa debido al alto coeficiente de determinación ($r^2=0.88$). Resultados similares se observaron entre el TPC y la

Table 4. Phenolic acid profile of raw, cooked, and bioprocessed maize grains.
Cuadro 4. Perfil de ácidos fenólicos de granos de maíz crudos, cocidos y bioprocesados

Phenolic acid	Sample	Phenolic acid content (mg 100 g ⁻¹ dry sample weight)		
		Free	Bound	Total
Ferulic	Raw	1.01±0.06 ^B	111.87±0.67 ^B	112.89±0.61 ^B
	Cooked	1.7±0.09 ^C	114.68±9.28 ^B	116.38±8.98 ^B
	Bioprocessed (108 h)	9.07±0.02 ^A	286.89±7.74 ^A	292.19±6.05 ^A
<i>p</i> -coumaric	Raw	0.34±0.02 ^B	11.61±0.57 ^B	11.96±0.59 ^B
	Cooked	1.04±0.01 ^C	10.51±1.16 ^B	11.55±1.12 ^B
	Bioprocessed (108 h)	2.78±0.26 ^A	22.90±1.15 ^A	25.06±0.81 ^A
Sinapic	Raw	1.66±0.12 ^B	ND	1.66±0.12 ^B
	Cooked	0.94±0.07 ^C	ND	0.94±0.07 ^C
	Bioprocessed (108 h)	6.05±0.95 ^A	ND	6.05±0.95 ^A
<i>p</i> -hydroxybenzoic	Raw	0.015±0.0 ^B	ND	0.015±0.0 ^B
	Cooked	0.015±0.0 ^B	ND	0.015±0.0 ^B
	Bioprocessed (108 h)	0.4±0.05 ^A	ND	0.4±0.05 ^A

^{A-B} Means with different superscripts in a column are statistically different ($p\leq 0.05$). Data were expressed as means±SD. ND=not detected. ♦ Medias ^{A-B} con superíndices diferentes en una columna son estadísticamente diferentes ($p\leq 0.05$). Los datos se expresaron como medias±SD. ND=no detectado.

revealed that the greatest content of phenolic acids in maize grains exist in the bound form; ferulic acid was the most abundant (89-92 %) followed by *p*-coumaric acid (7-9 %), while sinapic and *p*-hydroxybenzoic acids were not detected in the bound extracts. López-Martínez *et al.* (2009) and Mora-Rochin *et al.* (2010) reported similar contents of bound and free ferulic acid in raw maize, but these authors analyzed only the ferulic acid content of maize. According to Adom and Liu (2002), in maize grains, approximately 85 % of phenolic acids are found in bound form, while ferulic acid accounts for the highest level of hydroxycinnamic acids in cereal grains.

In our research, soaked and cooked maize flours (unfermented) were used to study the effect of cooking on the phenolic acid profile. The cooking process increased free ferulic (70 %, $p \leq 0.05$) and free *p*-coumaric (200 %, $p \leq 0.05$) acid content and decreased free sinapic acid content (43 %, $p \leq 0.05$). Schmidt *et al.* (2014) and Ryu and Koh (2016) reported a change of phenolic acid profile during soaking and cooking process. Schmidt *et al.* (2014) informed that *p*-coumaric acid content, increased due to the heat treatment (cooking) of rice bran whereas ferulic and *p*-hydroxybenzoic acids were not affected by this treatment. To investigate the effect of soaked water elimination, Ryu and Koh (2016) cooked two varieties of black rice (Sintoheugmi and Sinnongheugchal cultivars) with either soaking water (boiling 1) or fresh distilled water (boiling 2). Boiling 1 and 2 increased free-form protocatechuic and vanillic acids and decreased free-form *p*-coumaric acid in both cultivars. In contrast, these treatments increased free-form ferulic acid in the Sintoheugmi cultivar but a reduction of this phenolic acid in the Sinnongheugchal cultivar. Also, boiling 1 increased bound-form ferulic acid in Sinnongheugchal cultivar, while boiling 2 decreased this phenolic acid in the same cultivar. Boiling 1 caused a higher increase of phenolic acids than boiling 2. These findings indicate that the hydrophilic phenolic acids could be released into the cooking water during soaking. Differences in the phenolic acid profile might be caused by the dissimilarities in the extraction method, cooking process, and substrate utilized.

Our study also revealed that SSB increased ($p \leq 0.05$) the content of bound phenolic acids in maize and there was an increment of about two-fold ($p \leq 0.05$) in bound ferulic and *p*-coumaric acid

actividad antioxidante analizados con el método ABTS ($r^2 = 0.92$, $r = 0.96$; $p = 0.001$).

Nuestros datos son consistentes con los de Segev *et al.* (2010), Yao *et al.* (2011) y Guzmán-Urriarte *et al.* (2013), quienes reportaron correlaciones altamente significativas entre el TPC y la AoxA en semillas de leguminosas enteras y crudas. Los compuestos fenólicos son los principales compuestos fitoquímicos que contribuyen a la actividad antioxidante total de los granos (Yao *et al.*, 2010). La presencia de estos compuestos en los granos se asocia con una reducción en el cáncer de corazón y diabetes. Además, a los fenólicos se les atribuyen propiedades antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias y antialérgicas. La mayoría de los beneficios a la salud podrían resultar de su actividad antioxidante (Randhir y Shetty, 2007).

Efecto de la bioconversión en estado sólido sobre el perfil de ácidos fenólicos de los granos de maíz

En los granos de maíz se identificaron cuatro ácidos fenólicos principales en formas libres y ligadas: ferúlico, *p*-cumárico, sinápico y *p*-hidroxibenzoico (Cuadro 4). Nuestros resultados muestran que en el maíz cocido y bioprocesado, el ácido fenólico predominante fue el ferúlico (46-49 %), seguido del sinápico (25-33 %), *p*-cumárico (15-28 %) y *p*-hidroxibenzoico (0.2-2 %). En cuanto a las fracciones libres de maíz crudo, los principales ácidos fenólicos fueron el sinápico (54 %) y el ferúlico (33 %). Asimismo, nuestros resultados revelaron que el mayor contenido de ácidos fenólicos en los granos de maíz está en forma ligada; el ácido ferúlico fue el más abundante (89-92 %) seguido del *p*-cumárico (7-9 %), pero el sinápico y *p*-hidroxibenzoico no se detectaron en los extractos ligados. López-Martínez *et al.* (2009) y Mora-Rochin *et al.* (2010) informaron contenidos similares de ácido ferúlico libre y ligado en el maíz crudo, pero ellos solo analizaron el contenido de ácido ferúlico del maíz. De acuerdo con Adom y Liu (2002), en los granos de maíz, aproximadamente 85 % de los ácidos fenólicos están en forma ligada, mientras que el ácido ferúlico representa el nivel más alto de ácidos hidroxicinámicos en los granos de cereal.

En nuestra investigación se usaron harinas de maíz remojado y cocido (sin fermentar) para estudiar el efecto de la cocción sobre el perfil de ácidos fenólicos.

content. Also, SSB of maize caused an increased free ferulic (8-fold, $p \leq 0.05$), *p*-coumaric (7.2-fold, $p \leq 0.05$), sinapic (2.65-fold, $p \leq 0.05$) and free *p*-hydroxybenzoic (25-fold $p \leq 0.05$) acids, as compared to raw maize. Our results were consistent with the findings of Bhanja and Kuhad (2014) who observed an increment in free phenolic acid content in wheat fermented by *R. oryzae*. Schmidt *et al.* (2014) also reported increases in protocatechuic, gallic, caffeic, chlorogenic, *p*-hydroxybenzoic, syringic, ferulic, and vanillin acids in rice bran fermented by *R. oryzae* at different times. It is important to note that these authors used different solvents to extract free phenolic acids from fermented and unfermented substrates. However, without acid/base hydrolysis, the extraction of most of the insoluble bound phenolics using organic solvents only is difficult (Bhanja and Kuhad, 2014). In our study, solvent extraction and basic thermal hydrolysis were used to improve phenolic acid extraction from maize. According to Bhanja and Kuhad (2014), during SSB different carbohydrases produced by microorganisms can release the bound phenolics into a soluble form. In contrast, we observed that SSB increased both free and bound phenolic acids of maize.

Our results suggest that the SSB facilitates the access to the substrate, causing a higher release of free conjugated- and bound phenolic-acids of maize. It is difficult to compare our data with those reported in the literature because of the different methods used for the phenolic-compound-extraction. Furthermore, we did not find studies regarding free and bound phenolic acids in fermented maize. To our knowledge, this is the first study to evaluate the effect of time fermentation on bound and free phenolic acids in maize seeds bioprocessed by *R. oligosporus* NRRL 2710.

CONCLUSIONS

Fermentation periods of time could be manipulated to boost the total phenolic content and antioxidant activity in bioprocessed-maize flour. During SSB different carbohydrases and esterases, produced by microorganisms, can release the bound phenolic compounds into a soluble form. In contrast, in our research SSB increased both free and bound phenolic acids of maize, which suggest that the SSB facilitates the access to the substrate, causing a higher release

El proceso de cocción aumentó el contenido de ácido ferúlico libre (70 %, $p \leq 0.05$) y *p*-cumárico libre (200 %, $p \leq 0.05$) y disminuyó el del sinápico libre (43 %, $p \leq 0.05$). Schmidt *et al.* (2014) y Ryu y Koh (2016) informaron un cambio del perfil de ácidos fenólicos durante el remojo y proceso de cocción. Schmidt *et al.* (2014) reportaron que el contenido de ácido *p*-cumárico, aumentó debido al tratamiento térmico (cocción) del salvado de arroz, mientras que los ácidos ferúlico y *p*-hidroxibenzoico no fueron afectados por dicho tratamiento. Para investigar el efecto de eliminación de agua de remojo, Ryu y Koh (2016) cocieron dos cultivares de arroz negro (Sintoheugmi y Sinnongheugchal) con agua de remojo (ebullición 1) o agua destilada fresca (ebullición 2). Ebullición 1 y 2 aumentaron los ácidos protocatecúicos y vanílicos de forma libre y disminuyeron el *p*-cumárico libre en los dos cultivares. Por el contrario, estos tratamientos causaron un aumento del ácido ferúlico libre en el cultivar Sintoheugmi, pero una reducción del mismo en el cultivar Sinnongheugchal. Además, la ebullición 1 aumentó el ácido ferúlico en forma ligada en el cultivar Sinnongheugchal, mientras que la ebullición 2 disminuyó este ácido fenólico en el mismo cultivar. La ebullición 1 causó mayor aumento de ácidos fenólicos que la ebullición 2. Estos resultados indican que los ácidos fenólicos hidrofílicos se pueden liberar en el agua de cocción durante el remojo. Las diferencias en el perfil de ácidos fenólicos podrían ser causadas por las disimilitudes en el método de extracción, proceso de cocción y sustrato utilizado.

Nuestro estudio también reveló que la SSB incrementa ($p \leq 0.05$) el contenido de ácidos fenólicos ligados en el maíz y hubo un aumento casi del doble ($p \leq 0.05$) en el contenido de ácidos ferúlico y *p*-cumárico ligados. Además, la SSB de maíz aumentó los ácidos ferúlico libre (8 veces, $p \leq 0.05$), *p*-cumárico (7.2 veces, $p \leq 0.05$), sinápico (2.65 veces, $p \leq 0.05$) y *p*-hidroxibenzoico libre (25 veces, $p \leq 0.05$) comparado con el maíz crudo. Nuestros resultados fueron consistentes con los hallazgos de Bhanja y Kuhad (2014) quienes observaron un incremento en el contenido de ácidos fenólicos libres en trigo fermentado con *R. oryzae*. Schmidt *et al.* (2014) también informaron aumentos en los ácidos protocatecúico, gálico, cafeico, clorogénico, *p*-hidroxibenzoico, siríngico, ferúlico y vanílico en el salvado de arroz fermentado con *R. oryzae* a diferentes tiempos. Es importante notar que estos autores usaron diferentes solventes para extraer

of free conjugated- and bound phenolic-acids of maize. Solid-state bioconversion has the potential to convert maize grains into valuable compounds, such as free and bound phenolic acids. Bioprocessed maize flours are potentially safer and they might be a preferred alternative for a nutraceutical ingredient/supplement development for prevention and control of degenerative diseases derived from oxidative stress.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant from: *Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación* (PROFAP), Universidad Autónoma de Sinaloa, México.

LITERATURE CITED

- Adom, K. K., and R. H. Liu. 2002. Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6182-6187.
- Bhanja, D. T., and R. C. Kuhad. 2014. Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with *Rhizopus oryzae* RCK2012. *T. Biotechnol. Rep.* 4: 120-127.
- Bhanja, T., A. Kumari, and R. Banerjee. 2009. Enrichment of phenolics and free radical scavenging property of wheat koji prepared with two filamentous fungi. *Bioresour. Technol.* 100: 2861-2866.
- Cuevas-Rodríguez, E. O., N. M. Verdugo-Montoya, P. I. Angulo-Bejarano, J. Milán-Carrillo, R. Mora-Escobedo, L. A. Bello-Pérez, J. A. Garzón-Tiznado, and C. Reyes-Moreno. 2006. Nutritional properties of tempeh flour from quality protein maize (*Zea mays* L.). *Food Sci. Technol.* 39: 1072-1079.
- Design Expert. 2002. Version 6.04. STAT-EASE, MN, USA.
- Demirbas, A. 2005. β -Glucan and mineral nutrient contents of cereals grown in Turkey. *Food Chem.* 90: 773-777.
- Dewanto, V., X. Wu, and R.H. Liu. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4959-4964.
- Guzmán-Urriarte M. L., L. M. Sánchez-Magaña, G. Y. Angulo-Meza, E. O. Cuevas-Rodríguez, R. Gutiérrez-Dorado, S. Mora-Rochin, J. Milán-Carrillo, A. Valdez-Ortiz, and C. Reyes-Moreno. 2013. Solid state bioconversion for producing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) functional flour with high antioxidant activity and antihypertensive potential. *Food Nut. Sci.* 4: 480-490.
- López-Martínez, L. X., R. M. Oliart-Ros, G. Valerio-Alfaro, C. H. Lee, K. L. Parkin, and H.S. Garcia. 2009. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *Food Sci. Technol.* 42: 1187-1192.
- Maiti, D., and M. Majumdar. 2012. Impact of bioprocessing on phenolic content and antioxidant activity of two edible seeds to improve hypoglycemic functionality. *J. Nat. Pharm.* 3: 31-36.
- Mora-Rochin, S., J. A. Gutiérrez-Urbe, S. O. Serna-Saldivar, P. Sánchez-Peña, C. Reyes-Moreno, and J. Milán-Carrillo. 2014. Free and bound phenolic acids in maize grains and their effect on antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 62: 1111-1118.
- los ácidos fenólicos libres de sustratos fermentados y no fermentados. Sin embargo, sin hidrólisis ácida/básica, la extracción de la mayoría de los fenólicos ligados insolubles usando solo solventes orgánicos es difícil (Bhanja y Kuhad, 2014). En nuestro estudio se usaron extracción con solvente e hidrólisis térmica básica para mejorar la extracción de los ácidos fenólicos del maíz. De acuerdo con Bhanja y Kuhad (2014), durante la SSB, diferentes carbohidrasas producidas por microorganismos pueden liberar los fenólicos ligados en una forma soluble. Por el contrario, observamos que la SSB incrementó los ácidos fenólicos del maíz, tanto libres como ligados.
- Nuestros resultados sugieren que la SSB facilita el acceso al sustrato, causando una mayor liberación de ácidos fenólicos libres conjugados y ligados del maíz. Es difícil comparar nuestros datos con los informados en la bibliografía por los diferentes métodos usados para la extracción de los compuestos fenólicos. Además, no encontramos estudios sobre ácidos fenólicos libres y ligados en maíz fermentado. A nuestro entender, este es el primer estudio para evaluar el efecto del tiempo de fermentación sobre ácidos fenólicos ligados y libres en semillas de maíz bioprocesado con *R. oligosporus* NRRL 2710.

CONCLUSIONES

Los periodos de fermentación se pueden manipular para aumentar el contenido fenólico total y la actividad antioxidante en la harina de maíz bioprocesado. Durante la SSB, diferentes carbohidrasas y esterases (producidas por microorganismos) pueden liberar los compuestos fenólicos ligados en una forma soluble. En nuestra investigación, la SSB aumentó los ácidos fenólicos libres y ligados del maíz, lo cual sugiere que la SSB facilita el acceso al sustrato, causando una mayor liberación de ácidos fenólicos libres conjugados y ligados del maíz. La bioconversión en estado sólido tiene el potencial de convertir granos de maíz en compuestos valiosos tales como los ácidos fenólicos libres y ligados. Las harinas de maíz bioprocesado son potencialmente más seguras y podrían ser una alternativa preferida para el desarrollo de un suplemento/ingrediente nutracéutico para la prevención y control de enfermedades degenerativas derivadas del estrés oxidativo.

—Fin de la versión en Español—

2010. Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *J. Cereal Sci.* 52: 502-508.
- Naczki, M., and F. Shahidi. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41: 1523-1542.
- Ou, B., M. Hampsch-Woodill, and R. L. Prior. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4619-4626.
- Pozo-Insfran, D. D., C. H. Brenes, S. O. Serna-Saldivar, and S. T. Talcott. 2006. Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) products. *Food Res. Int.* 39: 696-703.
- Randhir, R., and K. Shetty. 2007. Mung beans processed by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 8: 197-204.
- Randhir, R., D. Vatter, and K. Shetty. 2004. Solid-state bioconversion of fava bean by *Rhizopus oligosporus* for enrichment of phenolic antioxidants and L-DOPA. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5: 235-244.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free. Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237.
- Reyes-Bastidas, M., E. Z. Reyes-Fernández, J. López-Cervantes, J. Milán-Carrillo, G. F. Loarca-Piña, and C. Reyes-Moreno. 2010. Physicochemical, nutritional and antioxidant activity properties of tempeh from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Sci. Technol. Int.* 16: 427-434.
- Reyes-Moreno, C., E. O. Cuevas-Rodríguez, J. Milán-Carrillo, O. G. Cárdenas-Valenzuela, and J. Barrón-Hoyos. 2004. Solid state fermentation process for producing chickpea (*Cicer arietinum* L) tempe flour. Physicochemical and nutritional characteristics of the product. *J. Sci. Food Agric.* 84: 271-278.
- Ryu, D., and E. Koh. 2016. Influence of cooking methods on free and bound phenolic acids in Korean black rice. *J. Food Process. Pres.* doi:10.1111/jfpp.12873
- Salar, R. K., M. Certik, and V. Brezova. 2012. Modulation of phenolic content and antioxidant activity of maize by solid state fermentation with *Thamnidium elegans* CCF 1456. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 17: 109-116.
- Sánchez-Magaña, L. M., E. O. Cuevas-Rodríguez, R. Gutiérrez-Dorado, A. E. Ayala-Rodríguez, A. Valdez-Ortiz, J. Milán-Carrillo, and C. Reyes-Moreno. 2014. Solid-state bioconversion of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Rhizopus oligosporus* to improve total phenolic content, antioxidant activity and hypoglycemic functionality. *Int. J. Food Sci. Nut.* 65: 558-564.
- Schmidt, C. G., L. M. Gonçalves, L. Prietto, H. S. Hackbart, and E. B. Furlong. 2014. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. *Food Chem.* 146: 371-377.
- Segev, A., H. Badani, Y. Kapulnik, I. Shomer, M. Or-en-Shamir, and S. Galili. 2010. Determination of polyphenols, flavonoids, and antioxidant capacity in colored chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Food Sci.* 75: S115-S119.
- Singleton, V. L., R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 299: 152-178.
- Sousa, B. P., and R. T. P. Correia. 2012. Phenolic content, antioxidant activity and antiamylolytic activity of extracts obtained from bioprocessed pineapple and guava wastes. *Braz. J. Chem. Eng.* 29: 25-30.
- Vatter, D. A., and K. Shetty. 2002. Solid-state production of phenolic antioxidants from cranberry pomace by *Rhizopus oligosporus*. *Food Biotechnol.* 16: 189-210.
- Wojdylo, A., and J. Oszmainsky. 2007. Comparison of the content of phenolic acid, α -tocopherol and their antioxidant activity in oat naked and weeded. *EJEAFChe.* 5: 1980-1988.
- Yao, Y., W. Sang, M. Zhou, and G. Ren. 2010. Antioxidant and α -glucosidase inhibition of colored grains in China. *J. Agric. Food Chem.* 58: 770-774.
- Yao, Y., X. Cheng, L. Wang, S. Wang, and G. Ren G. 2011. Biological potential of sixteen legumes in China. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 7048-7058.
- Zhao, Z., Y. Egashira, and H. Sanada. 2005. Phenolic antioxidants richly contained in corn bran are slightly bioavailable in rats. *J. Agric. Food Chem.* 53: 5030-5035.