



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

FoodUPV
INSTITUTO DE INGENIERIA DE ALIMENTOS

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos
(FoodUPV)

Efecto de la fermentación con *Pleurotus ostreatus* de
habas secas (*Vicia Fava* L.) sobre su composición
nutricional y su impacto sobre la digestibilidad de nutrientes
y compuestos bioactivos.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos

AUTOR/A: Martí García, Alberto

Tutor/a: Andrés Grau, Ana María

Cotutor/a: Heredia Gutiérrez, Ana Belén

Director/a Experimental: MUÑOZ PINA, SARA

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

EFFECTO DE LA FERMENTACIÓN CON *PLEUROTUS OSTREATUS* EN HABAS SECAS (*VICIA FABA* L.) SOBRE SU COMPOSICIÓN NUTRICIONAL Y SU IMPACTO SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE NUTRIENTES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS.

Autores: Alberto Martí García, Sara Muñoz Pina, Ana Heredia, Ana Andrés.

RESUMEN

Este estudio tiene como objetivo investigar los efectos de la fermentación en estado sólido con un hongo comestible (*Pleurotus ostreatus*) sobre las habas (*Vicia faba*), un alimento con un excelente perfil nutricional cuyo consumo es deficiente en las dietas actuales. La fermentación contribuyó al aumento del contenido proteico (16%) y, por lo tanto, al contenido en aminoácidos totales y, en mayor medida, los aminoácidos esenciales (17%), además de reducir el contenido en carbohidratos (9%). Después de la simulación de la digestión *in vitro*, no se observaron cambios en la digestibilidad de las proteínas, pero, si se produjo una disminución en la digestibilidad de carbohidratos y un aumento en la liberación de los aminoácidos valina, isoleucina y treonina, considerados vitales para la salud y correcto desarrollo en la infancia. Además, se observó un aumento muy significativo en la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina en las muestras fermentadas. Por lo tanto, los resultados de este estudio revelan la utilidad de este proceso para mejorar el perfil nutricional y digestivo de las habas.

PALABRAS CLAVE: Proteína, digestibilidad, *Pleurotus ostreatus*, factores antinutricionales, antioxidantes, minerales, fenoles.

RESUM

Aquest estudi té com a objectiu investigar els efectes de la fermentació en estat sòlid amb un bolet comestible (*Pleurotus ostreatus*) sobre les faves (*Vicia faba*), un aliment amb un excel·lent perfil nutricional el consum del qual és deficient en les dietes actuals. La fermentació va contribuir a un augment del contingut proteic (16%) i, per tant, del contingut en aminoàcids totals i, en major mesura, dels aminoàcids essencials (17%), a més de reduir el contingut en carbohidrats (9%). Després de la simulació de la digestió *in vitro*, no es van observar canvis en la digestibilitat de les proteïnes, però, sí que es va produir una disminució en la digestibilitat de carbohidrats i un augment en la lliberació dels aminoàcids valina, isoleucina i treonina, considerats vitals per a la salut i correcte desenvolupament en la infància. A més, es va observar un augment molt significatiu en la inhibició de l'enzim convertidor d'angiotensina en les mostres fermentades. Per tant, els resultats d'aquest estudi revelen la utilitat d'aquest procés per millorar el perfil nutricional i digestiu de les faves.

PARAULES CLAU: Proteïna, digestibilitat, *Pleurotus ostreatus*, factors antinutricionals, antioxidants, minerals, fenols.

ABSTRACT

This study aims to investigate the effects of solid-state fermentation with an edible fungus (*Pleurotus ostreatus*) on broad beans (*Vicia faba*), a food with an excellent nutritional profile whose consumption is deficient in current diets. Fermentation contributed to an increase in protein content (16%) and, therefore, in total amino acid content and, to a greater extent, essential amino acids (17%), besides reducing carbohydrate content (9%). After *in vitro* digestion simulation, no changes were observed in protein digestibility, but, a decrease in carbohydrate digestibility occurred and an increase in the release of the amino acids valine, isoleucine, and threonine, considered vital for health and proper childhood development. Additionally, a very significant increase in angiotensin-converting enzyme inhibition was observed in the fermented samples. Therefore, the results of this study reveal the usefulness of this process in improving the nutritional and digestive profile of broad beans.

KEYWORDS: Protein, digestibility, *Pleurotus ostreatus*, antinutritional factors, antioxidants, minerals, phenols

1. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, el aumento del sobrepeso ha emergido como uno de los desafíos predominantes durante el proceso de crecimiento de niños y adolescentes. La problemática del sobrepeso y la obesidad infantil ha suscitado una preocupación de alcance global. Se ha documentado que, en el periodo 2018-2020, un 29% de los niños entre 7 y 9 años residentes en la Región Europea, presentaban sobrepeso además de numerosos casos de obesidad según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2022). Esta tendencia alarmante mencionada se atribuye a la falta de promoción de hábitos alimentarios saludables, la adopción de un estilo de vida sedentario y otros cambios socioeconómicos. De acuerdo con los hallazgos más recientes, este problema se manifiesta incluso en naciones que siguen una dieta mediterránea, a pesar de los beneficios que esta conlleva para la salud (Maggi et al., 2021). En la época actual, los países situados en el sur de Europa exhiben algunas de las tasas más elevadas de obesidad infantil en el continente europeo (De España, 2021). Numerosos estudios han revelado un vínculo directo entre la obesidad infantil y adolescente y la predisposición al sobrepeso en la adultez (Biro & Wien, 2010). Asimismo, se ha constatado que la obesidad durante la adolescencia guarda una asociación significativa con un incremento en el riesgo de desarrollar enfermedades graves como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes tipo 2 en la etapa adulta (Weihrauch-Blüher et al., 2019) y la aparición de adenocarcinoma. Además, investigaciones adicionales han demostrado que los niños que padecen obesidad se caracterizan por una supresión de la inmunidad antitumoral (Weihe et al., 2020).

Una parte significativa de alimentos vinculados con la obesidad infantil son los conocidos “snacks”, comidas asociadas a productos para llevar, que contienen carbohidratos de rápida absorción, grasas saturadas y niveles elevados de sal. Estos alimentos que no ayudan a cubrir las necesidades nutricionales de los niños y, por lo tanto, supone un foco de preocupación para padres, pediatras, fabricantes de alimentos e investigadores. Además, actualmente los consumidores han puesto el foco en la búsqueda de nuevos productos que contribuyen a una dieta saludable y equilibrada, llevando a los productores a centrarse en la creación de “snacks” con un valor nutricional mejorado, utilizando ingredientes alternativos. La reducción de los carbohidratos de absorción rápida y el aumento de las proteínas vegetales en la composición de los snacks se consideran cada vez más estrategias para influir en las elecciones alimentarias, promoviendo patrones de alimentación saludables y previniendo la obesidad. Por todo ello, se anticipa que las preocupaciones medioambientales y el énfasis en la producción sostenible, así como el empleo de fuentes alternativas de proteínas, serán factores impulsores de las ventas de snacks (Dussimon, 2022).

Dentro de estas fuentes alternativas de proteínas encontramos a las legumbres, un alimento que forma parte de la dieta tradicional mediterránea y que es declarada como fuente valiosa de proteína dietética, sostenible medioambientalmente y de bajo coste (Charles S Brennan, 2016). Además, el cultivo de legumbres contribuye a la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero, promueve la fijación del nitrógeno atmosférico en los suelos y reduce la huella de carbono, lo que lo convierte en un cultivo sostenible (Stagnari et al., 2017). Las legumbres, son una fuente rica en proteínas, que oscila entre el 21% y el 31% en base seca, variando su contenido según la especie y el cultivo. Estas proteínas son ricas en aminoácidos esenciales como la lisina y la leucina. Además, diversos estudios han destacado la importancia de consumir legumbres por su aporte proteico y por su alto contenido en fibra dietética, así como por sus niveles significativos de minerales y polifenoles. Estos componentes han demostrado estar asociados con una menor prevalencia e incidencia de enfermedades como la obesidad, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y algunos tipos de cáncer (Hernández-Olivas et al., 2021). Sin embargo, es importante destacar que las legumbres presentan deficiencias en algunos aminoácidos esenciales, como la cisteína, la metionina y el triptófano, lo que ha motivado a investigadores a explorar mecanismos para mejorar su calidad proteica. Además, la calidad nutricional de las leguminosas puede verse afectada por la presencia de factores antinutricionales, que tienen efectos fisiológicos no deseados (Muzquiz et al., 2004). Estos compuestos se conocen como: lecitinas, inhibidores de proteasas, fitatos, taninos, oligosacáridos, saponinas y alcaloides. La presencia, distribución e impacto negativo de estos antinutrientes ha sido objeto de amplia evaluación y análisis (G. Grant, 1991).

Por lo tanto, el procesamiento previo al consumo de legumbres podría mejorar la calidad y la biodisponibilidad de sus nutrientes, como, por ejemplo, empleando la fermentación, un proceso biotecnológico que ayuda a reducir la cantidad de antinutrientes mediante la biotransformación ayudando asimismo en el enriquecimiento del contenido proteico y otros componentes funcionales. Recientemente, se han investigado diversos métodos de fermentación en estado sólido para legumbres como lentejas, soja y quinoa (Starzyńska-Janiszewska et al., 2020).

En el amplio espectro de microorganismos susceptibles de ser utilizados en la fermentación, los hongos ofrecen ciertas ventajas en comparación con otros microorganismos debido a su elevado contenido proteico (20-30% en materia seca) y su calidad proteica, ya que contienen todos los aminoácidos esenciales. Además, los hongos actúan como fuente de fibra dietética y tienen un alto contenido de vitamina B, además de ser bajos en grasa (J. A. Pineda-Insuasti, 2014). A pesar de esta información, hasta la fecha, no existen productos similares

en el mercado basados en la fermentación de legumbres tradicionales como lentejas, garbanzos o habas. De esta manera, el desarrollo de nuevos productos fermentados a partir de legumbres mediterráneas podría ampliar y diversificar la gama de productos proteicos de origen vegetal, lo que abriría nuevas oportunidades de mercado para las empresas del sector.

Por tanto, el presente estudio se centra en la producción de habas fermentadas en estado sólido utilizando *Pleurotus ostreatus* y tiene como objetivo investigar cómo la fermentación afecta a su contenido de nutrientes y antioxidantes, así como evaluar mediante un sistema estático de digestión *in vitro* su digestibilidad. El objetivo final es demostrar el potencial de las habas fermentadas como ingrediente para la creación de productos alimentarios innovadores.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales y reactivos

Las semillas de haba secas (*Vicia Faba L.*) se adquirieron en el Mercado Central de Valencia (España) de la marca Batlle®. La cepa *Pleurotus ostreatus* se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT20311).

Para las distintas determinaciones se han empleado los siguientes reactivos: Ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, cloruro de sodio, ácido tioglicólico, ácido fítico, 2,2'-bipiridina, acetilacetona, ácido ascórbico, acetato de etilo, ácido fórmico, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-etilbenciotiazolina-6-sulfónico), reactivo Folin-Ciocalteu, 2,4,6-tripiridil-s-triazina, ácido gálico, ácido (\pm)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, micopeptona y cloramfenicol se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE. UU.). Para la digestión, la pepsina de la mucosa gástrica porcina (3200-4500 U/mg, P6887), pancreatina (8 x USP, P7545) de páncreas porcino, p-tolueno-sulfonil-L-arginina metil éster, bilis bovina (B3883), sales de grado analítico, ácido bórico, ácido clorhídrico (37%), ácido sulfúrico (95-97%), hidróxido de sodio, D-+-glucosa ($\geq 99.5\%$), etanol (96%) e invertasa de levadura de pan (Grado VII, ≥ 300 unidades/mg sólido, I4504) de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE. UU.). Ácido acético glacial, ácido clorhídrico concentrado, etanol absoluto, éter etílico, carbonato de sodio, sulfato de hierro (III) dodecahidratado de amonio y EDTA Sal Cálctica Disódica se obtuvieron de Panreac AppliChem (Barcelona, España). Ácido nítrico (70%) acetónitrilo (grado HPLC), metanol (grado HPLC), cloruro de hierro (III) hexahidratado, acetato de sodio trihidratado y persulfato de potasio se obtuvieron de Honeywell Fluka (Morris Plains, NJ, EE. UU.).

2.2 Fermentación fúngica en estado sólido

Previamente a la inoculación del cultivo de *Pleurotus ostreatus*, las habas fueron hidratadas durante 16 horas a temperatura ambiente en proporción 1:6. Tras la hidratación, se escaldaron durante 2 minutos y se enfriaron con abundante agua. Seguidamente se esterilizaron en autoclave (Autoclave de soporte vertical 4002136, JP Selecta™, Barcelona, España) durante 20 min a 121° C. Posteriormente, se prepararon en tarros de fermentación previstos con filtro T1 (50 g cada uno) y se inocularon con 5 ml de cultivo iniciador de *Pleurotus ostreatus*. La incubación se mantuvo durante 10 días a 25°C en una incubadora digital (horno digital 2001249, JP Selecta™, Barcelona, España). El cultivo iniciador se preparó previamente en un líquido de cultivo compuesto por un 2% de glucosa, 2% de extracto de malta y 0.1% de micopeptona, manteniendo este cultivo en agitación horizontal a 25°C durante 14 días en una incubadora digital (JP Selecta™ horno digital 4002136, Barcelona, España)

2.3 Determinaciones analíticas de las habas

2.3.1. Características fisicoquímicas

Para determinar si los cambios nutricionales se deben a la fermentación o al procesamiento previo, se analizaron tres muestras diferentes. En primer lugar, las habas hidratadas durante 16h (habas remojadas (HR)). En segundo lugar, habas escaldadas, esterilizadas e incubadas (habas autoclavadas (HA)). Finalmente, habas fermentadas (HF) que se han sometido a las mismas condiciones que las autoclavadas, pero inoculadas con *Pleurotus ostreatus*.

Los análisis del contenido en humedad, grasa, cenizas y proteína determinados en las habas se realizaron acorde a los métodos oficiales (AOAC, 2000). La humedad se evaluó a través del cambio en el peso de las muestras antes y después del proceso de secado hasta alcanzar una masa constante. El contenido de grasa en las muestras se determinó mediante el método Soxhlet utilizando éter de petróleo (60:40). La cantidad de proteína se calculó a partir del contenido de nitrógeno total utilizando el método Kjeldahl, con un factor Kjeldahl de 6,25. Para evaluar el contenido de cenizas, las muestras se sometieron a calcinación en una mufla a 550 °C durante 10 horas hasta obtener peso constante (Select-Horn, JP-SELECTA). Finalmente, los carbohidratos se calcularon por diferencia. Los resultados se expresaron en gramos por cada 100 g de materia seca.

Para determinar el contenido final de biomasa tras la fermentación (Sánchez-García et al., 2023), una muestra seca de 100 mg se mezcló con 2,4 mL de ácido sulfúrico al 72% a una temperatura de 25°C durante 24 horas. Posteriormente, se diluyeron las muestras con 55 mL de agua destilada y se sometieron a esterilización a 121°C durante 2 horas. Tras ello, se tomó una alícuota de 1 mL

del hidrolizado neutralizado y se combinó con 1 mL de acetilacetona, calentando la mezcla en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos. Tras enfriar la muestra, se añadieron 6 mL de etanol y 1 mL de reactivo de Ehrlick. La absorbancia se registró a 530 nm tras incubar la mezcla a 65°C durante 10 minutos y enfriarla. Los resultados se expresaron en mg de glucosamina por g en base seca.

2.3.2. Análisis cuantitativo de los fenoles totales, componentes antioxidantes y taninos

Para la elaboración de todos los ensayos, en primer lugar, se realizó una extracción etanólica de los compuestos fenólicos (Caprioli et al., 2018). Una alícuota de 20 mL de etanol al 70% se añadió a 5 g de la muestra sólida. A continuación, se añadió HCl 2N a la muestra hasta alcanzar un pH de 2, tras ello, la muestra se sometió durante 120 min a una sonicación a 20°C. Tras la extracción, la muestra se centrifugó a 8000g durante 15 minutos. La extracción se repitió dos veces y los sobrenadantes se juntaron en una única alícuota. Finalmente, el extracto se filtró con un filtro de PTFE de 0.45 µm.

En cuanto al contenido total de fenoles (TPC), se empleó el método Folin-Ciocalteu (Aranibar et al., 2018). Se tomó 10 µL de cada extracto y se mezcló con 1,58 mL de agua bidestilada. Luego, se añadieron 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu y se agitó 3 minutos. Tras esto, se incorporaron 300 µL de Na₂CO₃ al 20%, la mezcla se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 60 minutos y se midió la absorbancia a 765 nm (UV/vis, Beckman Coulter du 730). Previamente, se preparó una curva estándar de ácido gálico de 0 a 500 mg/L ($r^2=997$) y los resultados se expresaron en miligramos de equivalente de ácido gálico (GAE) por g de alimento en base seca.

Para la actividad antioxidante, se llevaron a cabo tres distintos métodos: ABTS, DPPH y FRAP (Thaipong et al., 2006). Se utilizó el mismo extracto etanólico mencionado previamente. Para todos los métodos, los resultados se expresaron en mg de trolox por g en base seca, utilizando una curva estándar que emplea el trolox como referencia (en un rango de 0 a 200 mg/L).

Finalmente, el contenido en taninos de los extractos de las habas se determinó mediante el ensayo acidificado de la vanillina (Downey & Hanlin, 2010). En este, se mezclaron 50 µL del extracto con 200 µL de reactivo de vanillina (compuesto por 3% de vanillina y 14% de HCl en MeOH) y se dejó reaccionar durante 20 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se registró a 500 nm (UV/vis, Beckman Coulter du 730) y el resultado de las muestras se expresó en equivalentes de catequina (mg CAE /g base seca).

2.4 Digestión estática *in vitro*

Las habas remojadas, autoclavadas y fermentadas fueron digeridas simulando una fase oral, gástrica e intestinal en condiciones de un adulto sano (Minekus et al., 2014). Los detalles se muestran a continuación:

Fase oral: Se diluyen 5g de muestra en 5 mL Fluido Salival Simulado (SSF), previamente calentado a 37°C y se dejó incubar en agitación durante 2 min a 37°C.

Fase gástrica: Tras la fase oral se añadió a la mezcla resultante Fluido Gástrico Simulado (SGF) en relación 1:1 el cual contenía una solución de pepsina porcina preparada previamente con una actividad de 2,000 U/mL y se ajustó el pH a 3.0 añadiendo HCL 1M. Posteriormente, las muestras se incubaron en agitación durante 2h a 37°C, ajustando periódicamente el pH a 3.0.

Fase intestinal: Se añadió a la mezcla Fluido Intestinal Simulado (SIF) en relación 1:1 y se ajustó el pH a 7.0 añadiendo NaOH 1M. El SIF contenía las enzimas pancreatina y pepsina con una actividad de 5.35U/mg y 3883 U/mg respectivamente. La concentración final de sales biliares fue de 10mM. Finalmente, las muestras se incubaron en agitación durante 2h a 37°C ajustando siempre el pH a 7.0. Al final de la fase intestinal, se añadió 4mL del inhibidor Bowman-Birk en una concentración de 0,05 g/L para inhibir la actividad enzimática. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 8000 g durante 10 min a 4°C. Del sobrenadante se tomaron diferentes alícuotas y se congelaron a -20°C.

2.5. Proteína soluble (TCA)

La hidrólisis proteica se evaluó midiendo la fracción de proteína soluble en TCA. Se siguió el procedimiento descrito por (Hernández-Olivas, et al., 2022). Se añadió la solución TCA a las muestras digeridas para llegar a una concentración del 12% y se dejaron reaccionar durante 15 minutos en un mezclador (Eppendorf Thermomixer, Alemania). A continuación, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 rpm (Eppendorf MiniSpin Plus, Alemania) para diluir posteriormente el sobrenadante en un buffer (50mM EDTA y 8M de Urea a pH 10). La absorbancia se midió en cubetas de cuarzo a 280 nm y los resultados se expresaron en g de tirosina/ 100 g de proteína.

2.6. Perfil de aminoácidos

Para determinar el perfil de aminoácidos de las habas, se realizaron hidrólisis alcalina e hidrólisis ácida (Lee et al., 2022). Para la hidrólisis ácida, se mezcló 0,2 g de la muestra con 10 mL HCl 6 M y se calentó a 110 °C durante 24 horas. Posteriormente, la muestra se reconstituyó con HCL 20 mM. Para la hidrólisis alcalina, 0,2 g de muestra se mezclaron con 10 MI de LiOH·H₂O 4.3 M a 120 °C durante 16 horas. Ambos extractos se filtraron con un filtro de celulosa 0,2 µm y

se derivatizaron. La fracción bioaccesible se filtró de manera similar y se llevaron a derivatizar. La fase de derivatización se llevó a cabo empleando el kit comercial Waters AccQ-Tag. Una vez las muestras estaban listas, se analizaron con un HPLC Serie 1200 con detector de diodos (Agilent, Palo Alto, CA, EE. UU.). Para cuantificar los compuestos identificados, se utilizó una curva de calibración y los resultados se expresaron en mg de aas libres / g en base seca.

2.7. Extensión de la glicólisis

Para el análisis de los azúcares reductores de las diferentes muestras sin digerir se siguió la metodología propuesta por (Sansano et al., 2015). Se preparó el reactivo DNS combinando ácido 3,5-dinitrosalicílico con una concentración de 10 g/L con 300 g de tartato de sodio y potasio tetrahidratado, y 16 g de NaOH. Para obtener el extracto se mezcló y agitó vigorosamente 0,3 g de muestra con 2 mL de etanol al 80% y se dejó reposar 30 minutos. Finalmente, se centrifugó a 5000 xg durante 5 minutos dos veces y se mezclaron los sobrenadantes obtenidos.

Se tomó 500 µL de la muestra y se combinó con 1 mL de DNS. La mezcla fue calentada a 100 °C durante 5 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. La muestra se diluyó con 6 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 530 nm. Los resultados se expresaron en mg de azúcar/ g de muestra en b.s.

En el caso de las muestras digeridas, 1 mL de fracción bioaccesible se mezcló con 4 mL de etanol absoluto. Tras ello, 50 µL de esta mezcla se añadió a 250 µL de la solución enzimática (1% de amiloglucosidasa + 1% de invertasa en buffer de acetato, pH 5.2) y se incubó a 37 °C durante 10 minutos. Posteriormente se añadió 750 µL de DNS y se calentó 15 minutos a 100°C. Finalmente se adicionaron 4 mL de agua fría desionizada y se midieron absorbancias a 530 nm.

La extensión de glicólisis se calculó usando la ecuación (1):

$$\text{Extensión de glicólisis (\%)} = \frac{\text{g de glucosa libre en la fracción bioaccesible}}{\text{g de almidón (equivalente de glucosa) en no digerido}} \times 100$$

2.8. Antioxidantes

El análisis de TPC, ABTS, DPPH, FRAP y taninos de la fase bioaccesible del digerido tras la etapa intestinal se realizaron siguiendo las metodologías descritas anteriormente (apartado 2.3.2) pero utilizando una alícuota del digerido en lugar de los extractos.

2.9. Análisis de minerales

La determinación de la cantidad de minerales (Fe, Ca y Mg) antes y después de la digestión gastrointestinal se llevó a cabo mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). El extracto mineral se preparó

siguiendo el método descrito por (Barrera et al., 2009). Se tomó una muestra de 5 g para el alimento sin digerir y se extrajo una porción de 3.5 mL de la fracción bioaccesible del alimento digerido. Las muestras se sometieron a incineración a 550 °C durante 10 horas hasta obtener cenizas blancas. Estas cenizas blancas se suspendieron en 1.5 mL de ácido nítrico al 69% y 4 mL de agua bidestilada. Las muestras diluidas se analizaron con el ICP-MS y los resultados se expresaron en mg /100 g en base seca.

2.10. Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA ia (%))

Se determinó el porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA ia) para las muestras antes y después de la digestión *in vitro*, siguiendo la metodología detallada por (Hernández-Olivas, et al., 2022). En el caso de las muestras no digeridas, se llevó a cabo una extracción proteica (Sánchez-García et al., 2023) y, para las muestras digeridas, la determinación se realizó en la fracción bioaccesible.

El reactivo ECA (25 mU/mL) y el sustrato Hip-His-Leu (5 mM) se disolvieron por separado en un tampón de base Tris 0.15 M con NaCl 0.3 M, ajustando el pH a 8.3. Se incluyeron tres controles: (i) 100 µL de ECA + 40 µL de agua destilada, (ii) 140 µL de agua destilada, y (iii) 100 µL de agua destilada + 40 µL de extracto/digestión de muestra, junto con las muestras (100 µL de ECA + 40 µL de extracto/digestión de muestra). Posteriormente, se incubaron a 37 °C durante 5 minutos. Se agregaron 100 µL de sustrato a cada tubo y se continuó el proceso de incubación durante 30 minutos a la misma temperatura. Luego, se detuvo la reacción agregando 150 µL de HCl 1 M, se añadieron 1 mL de acetato de etilo y se mezclaron enérgicamente en un agitador vortex. Después de centrifugar las muestras a 1200 g durante 10 minutos, se tomó 750 µL del sobrenadante y se transfirió a tubos limpios. El acetato de etilo presente en el sobrenadante se evaporó mediante agitación suave a 80 °C. El ácido hipúrico sólido restante en los tubos se disolvió en 1 mL de agua destilada y se registró la absorbancia a 228 nm. El resultado se calculó mediante la Ec. (2):

$$ECA\ ia\ (\%) = 100 - \left\{ 100 \times \frac{(C - D)}{(A - B)} \right\}$$

donde A, B, C y D representan las absorbancias de ECA + agua destilada, agua destilada, ECA + extracto/digestión de muestra y agua destilada + extracto/digestión de muestra, respectivamente.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Estudio de los cambios en la composición proximal del haba tras la fermentación.

La Tabla 1 recoge los resultados de caracterización de las muestras, dónde el procesado parece no alterar significativamente la caracterización de las habas, sin embargo, cambios significativos se encontraron tras la fermentación. El contenido final en biomasa fue de 73,67 mg de glucosamina/ g b.s, valor superior a otras legumbres (Sánchez-García et al., 2023). La presencia del hongo aumenta la proteína total de 30,98 a 36,65 g /100g b.s, (16%). Esto se debe a dos motivos, el alto contenido proteico unicelular del hongo (17-42%) y su proceso de fermentación. En este proceso de fermentación, el hongo emplea los carbohidratos de las habas para su crecimiento (el contenido en carbohidratos disminuye de 64,18 a 58,40 g /100g b.s). Estos carbohidratos pasarán a convertirse en proteínas complejas, péptidos o incluso aminoácidos libres (Adamovic et al., 1998). En otros casos como el estudio de la lenteja (Sánchez-García et al., 2023) se observa que este aumento no es tan pronunciado como en la *Vicia Faba L.* El aumento interviene tanto en la construcción de tejidos y fluidos, como en las funciones regulatorias y catalíticas, aporte de energía y saciedad, desarrollo cognitivo y mantenimiento de un peso saludable especialmente en niños (De Vries-Ten Have et al., 2020).

En relación al aumento del contenido proteico (Tabla 2) se observa un aumento en el contenido de aminoácidos esenciales (25%) y aminoácidos no esenciales (16%), ya que la fermentación sólida implica la bioconversión de proteínas modificando la calidad proteica y el perfil de aminoácidos (Li, Cao, et al., 2024). Respecto a los aminoácidos esenciales se observa un aumento en la leucina, valina y metionina, responsables de la síntesis de proteínas musculares, crecimiento muscular y reparación y mantenimiento de tejidos, procesos esenciales en el desarrollo infantil. Además, en referencia a los aminoácidos no esenciales podemos observar un aumento en los niveles de glicina, importante en la regulación del sueño, del estrés y función cognitiva, alanina, encargada en mantener los niveles de azúcar en sangre correctos y síntesis de proteína y tirosina, encargada de asegurar el desarrollo normal infantil (Hammarqvist et al., 2010).

Respecto a los compuestos minoritarios, los minerales estudiados no presentaron diferencias significativas entre ellos, sin embargo, el contenido en cenizas si disminuyó significativamente, descenso debido al metabolismo microbiano, pues los microorganismos utilizan diferentes minerales como materia prima para su propio crecimiento y metabolismo. Por otro lado, en cuanto al contenido en taninos se observa un descenso en el haba autoclavada y en el haba fermentada. Uno de los procesos que sufre estas dos muestras es el

autoclavado, un proceso de altas temperaturas que provoca una eliminación del contenido de taninos debido a su característica termolábil. El contenido tras la fermentación desciende aún más debido a la presencia del hongo, el cual secreta taninas (Rousta et al., 2022), enzimas que hidroliza taninos.

Respecto al contenido total de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante observamos en la Tabla 1 como la fermentación disminuye estos parámetros. En el caso del contenido total de fenoles (TPC), este descenso se produce debido a la bajada de los taninos condensados, ya que son fenoles (más abundantes en las habas). En el caso de los antioxidantes, la secreción de lacasas (fenoloxidasas) por parte del hongo podrían catalizar reacciones que pueden polimerizar, despolimerizar o transformar los compuestos fenólicos (Sinsabaugh, 2010). Situación similar que ocurre en la fermentación de legumbres con *Rhizopus oligosporus* (Verni et al., 2019).

Tabla 1. Composición proximal (g/100 g en base seca), biomasa (mg glicosamina/ g b.s) contenido en minerales (mg/100g b.s) y contenido en fenoles, antioxidantes y taninos (mg CAE, mg TE y mg catequin/100g b.s) de las muestras: Habas remojadas (HR), Habas autoclavadas (HA) y Habas fermentadas (HF).

Muestras	Habas remojadas (HR)	Habas autoclavadas (HA)	Habas fermentadas (HF)
<i>Componentes mayoritarios</i>			
Humedad (g/100g b.s)	131,76 ± 1,84 ^a	191,54 ± 1,70 ^b	121,73 ± 14,95 ^a
Proteína (g/100g b.s)	30,98 ± 1,31 ^a	30,41 ± 0,39 ^a	36,65 ± 0,70 ^b
Grasa (g/100g b.s)	1,25 ± 0,14 ^a	1,61 ± 0,07 ^a	1,20 ± 0,66 ^a
Carbohidratos (g/100g b.s)	64,18 ± 1,62 ^a	64,77 ± 0,50 ^a	58,40 ± 0,94 ^a
Cenizas (g/100g b.s)	3,90 ± 0,02 ^a	3,54 ± 0,18 ^a	2,82 ± 0,17 ^b
Biomasa (mg glicosamina /g b.s)	-	-	73,67 ± 3,23 ^b
<i>Componentes minoritarios y capacidad antioxidante</i>			
Magnesio (mg/100g b.s)	163,53 ± 5,15 ^a	171,5 ± 9,57 ^a	151,06 ± 5,74 ^a
Calcio (mg/100g b.s)	196,18 ± 9,84 ^a	200 ± 5,65 ^a	182,88 ± 13,21 ^a
Hierro (mg/100g b.s)	4,08 ± 0,31 ^a	4,26 ± 0,42 ^a	3,57 ± 0,08 ^a
TPC (mg CAE/ 100g b.s)	5,28 ± 0,42 ^a	2,94 ± 0,09 ^b	2,57 ± 0,14 ^b
DPPH (mg TE/100g b.s)	7,14 ± 0,03 ^a	4,64 ± 0,14 ^b	2,84 ± 0,13 ^c
ABTS (mg TE/100g b.s)	7,84 ± 0,26 ^a	3,13 ± 0,17 ^b	5,09 ± 0,14 ^c
FRAP (mg TE/100g b.s)	5,45 ± 0,31 ^a	2,90 ± 0,16 ^b	1,42 ± 0,14 ^b
Taninos (mg catequin/100 g b.s)	5,20 ± 0,21 ^a	1,30 ± 0,07 ^b	0,97 ± 0,06 ^b

Los datos que han sido presentados son valores medios de triplicados. Letras minúsculas diferentes indican que hay diferencias entre los valores de las 3 muestras estudiadas con un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$).

Tabla 2. Perfil de aminoácidos (mg/g en base seca) de las muestras sin digerir y digeridas: Habas remojadas (HR), Habas autoclavadas (HA) y Habas fermentadas (HF).

Aminoácidos (mg AA libres/ g base seca)	Sin digerir			Digeridas		
	Habas remojadas (HR)	Habas autoclavadas (HA)	Habas fermentadas (HF)	Habas remojadas (HR)	Habas autoclavadas (HA)	Habas fermentadas (HF)
<i>Ácido aspártico</i>	30 ± 3 ^a	27 ± 1 ^a	39,1 ± 0,5 ^b	1,6 ± 0,2 ^a	2,08 ± 0,05 ^a	3,4 ± 0,3 ^b
<i>Serina</i>	12 ± 1 ^a	10,7 ± 0,3 ^a	15 ± 1 ^a	6,2 ± 0,3 ^a	6,85 ± 0,03 ^{ab}	7,5 ± 0,4 ^b
<i>Ácido glutámico</i>	46 ± 5 ^a	37 ± 2 ^a	49 ± 2 ^a	4,8 ± 0,7 ^a	5,9 ± 0,1 ^{ab}	7,3 ± 0,2 ^b
<i>Glicina</i>	16 ± 1 ^a	18,5 ± 0,3 ^a	25 ± 1 ^b	3,7 ± 0,2 ^a	3,6 ± 0,2 ^a	3,5 ± 0,2 ^a
<i>Histidina</i>	5,5 ± 0,5 ^a	4,8 ± 0,3 ^a	4,9 ± 0,3 ^a	8,0 ± 0,3 ^a	8,4 ± 0,4 ^a	7,6 ± 0,4 ^a
<i>Arginina</i>	27 ± 2 ^b	20 ± 1 ^a	26 ± 1 ^b	19,2 ± 0,4 ^b	18,9 ± 1,1 ^b	11,5 ± 0,6 ^a
<i>Treonina</i>	8,1 ± 0,4 ^b	5,7 ± 0,2 ^a	9,1 ± 0,6 ^b	2,1 ± 0,2 ^a	2,03 ± 0,08 ^a	2,7 ± 0,2 ^b
<i>Alanina</i>	9,3 ± 3 ^a	7,4 ± 0,3 ^{ab}	11,9 ± 0,8 ^b	3,5 ± 0,1 ^a	3,5 ± 0,1 ^a	4,1 ± 0,2 ^b
<i>Prolina</i>	10,4 ± 1,5 ^a	9,3 ± 0,2 ^a	12,1 ± 0,7 ^a	1,40 ± 0,03 ^a	1,35 ± 0,03 ^a	1,56 ± 0,01 ^b
<i>Cisteína</i>	1,9 ± 0,3 ^a	1,3 ± 0,05 ^a	1,8 ± 0,1 ^a	0,74 ± 0,01 ^a	0,92 ± 0,01 ^b	1,04 ± 0,03 ^c
<i>Tirosina</i>	5,1 ± 0,4 ^a	4,6 ± 0,3 ^a	6,5 ± 0,3 ^b	8,2 ± 0,5 ^b	7,8 ± 0,9 ^b	4,1 ± 0,2 ^a
<i>Valina</i>	10,5 ± 1,1 ^a	8,9 ± 0,7 ^a	13,9 ± 0,4 ^b	4,6 ± 0,2 ^a	4,7 ± 0,2 ^a	5,5 ± 0,2 ^b
<i>Metionina</i>	0,76 ± 0,03 ^a	0,7 ± 0,1 ^a	1,22 ± 0,06 ^b	0,80 ± 0,03 ^b	0,94 ± 0,01 ^c	0,67 ± 0,02 ^a
<i>Lisina</i>	16,2 ± 0,5 ^a	14,9 ± 0,7 ^a	19,8 ± 0,8 ^b	13,1 ± 0,2 ^b	13,6 ± 0,7 ^b	9,5 ± 0,6 ^a
<i>Isoleucina</i>	8,6 ± 0,8 ^a	7,0 ± 0,7 ^a	11,6 ± 0,2 ^b	4,1 ± 0,1 ^a	4,2 ± 0,1 ^a	4,6 ± 0,1 ^b
<i>Leucina</i>	18,0 ± 0,6 ^a	17,4 ± 0,8 ^a	24 ± 1 ^b	12,5 ± 0,1 ^b	12,4 ± 0,7 ^b	7,3 ± 0,1 ^a
<i>Fenilalanina</i>	9,9 ± 0,2 ^a	9,7 ± 0,5 ^a	13,1 ± 0,5 ^b	7,7 ± 0,2 ^b	7,6 ± 0,6 ^b	5,3 ± 0,3 ^a
<i>Triptófano</i>	2,3 ± 0,2 ^a	2,4 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,2 ^a	2,17 ± 0,06 ^b	2,42 ± 0,07 ^c	0,15 ± 0,02 ^a
<i>AAE</i>	80 ± 4 ^a	72 ± 4 ^a	100 ± 4 ^b	55 ± 2 ^b	56 ± 3 ^b	43 ± 2 ^a
<i>AANE</i>	160 ± 18 ^b	136 ± 6 ^a	186 ± 8 ^a	49 ± 3 ^b	51 ± 3 ^b	44 ± 2 ^a
<i>AAE/AANE ratio</i>	0,50 ± 0,08 ^a	0,52 ± 0,05 ^a	0,53 ± 0,04 ^c	1,12 ± 0,08 ^a	1,10 ± 0,11 ^a	0,98 ± 0,09 ^a

Los datos que han sido presentados son valores medios de triplicados. Letras minúsculas diferentes indican que hay diferencias entre los valores de las 3 muestras estudiadas con un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$). AAE/AANE: Relación entre aminoácidos esenciales y no esenciales.

3.2 Efecto de la fermentación de las habas sobre la digestibilidad de las proteínas.

La proteólisis ocurre a lo largo de la digestión gastrointestinal, donde las proteínas se hidrolizan en pequeños péptidos y aminoácidos libres que se absorben posteriormente por el organismo. La digestibilidad de la proteína en los tres tipos de haba se evaluó mediante la prueba de proteína soluble en TCA, correspondiente a pequeños péptidos y aminoácidos libres en la fracción bioaccesible después de la etapa intestinal. Tal y como se muestra en la Figura 1, los resultados variaron entre $47,25 \pm 2,07$ y $30,93 \pm 1,51$ g de tirosina/100 gramos de proteína, siendo significativamente menor para el haba fermentada. Los cambios que se producen tanto en la estructura primaria de las proteínas (perfil de aminoácidos) como en la estructura secundaria (plegamiento de este perfil de aminoácidos) debido a la fermentación, podrían estar asociados a la degradación química debido al pH y a las enzimas digestivas, factores que afectarían a su digestibilidad. En relación con la estructura secundaria, como estructura rígida, la lámina- β contiene un gran número de enlaces hidrógeno que dificulta la acción enzimática sobre las proteínas (Li, Zhang, et al., 2024) En nuestro caso, observamos aumentos en aminoácidos como la metionina (60%), sensible a formar enlaces disulfuro resistentes a las enzimas, por lo que, tras la fermentación, la digestibilidad de las proteínas disminuye.

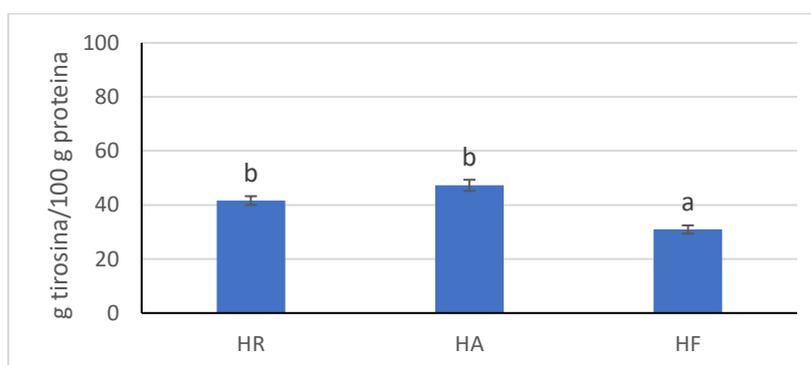


Figura 1. Proteína soluble en TCA (g tirosina/ 100g de proteína) de las fracciones bioaccesibles de la digestión de las muestras estudiadas (HR, HA y HF)

Por otra parte, el análisis del perfil de aminoácidos libres en la fracción bioaccesible del digerido tras la etapa intestinal (Tabla 2), nos muestra como la relación de aminoácidos esenciales (AAE)/aminoácidos no esenciales (AANE), indicador clave de la calidad de las proteínas, alcanzó valores cercanos a 1, fluctuando entre 0,98 y 1,12, por lo que nos encontramos ante unos productos con muy buena calidad proteica.

Las habas que han sido autoclavadas no han sufrido grandes cambios remarcables sobre aquellas que han sido remojadas excepto por un ligero aumento en cisteína y tirosina. Sin embargo, el digerido de las habas fermentadas mostró una tendencia diferente. Se mostró una disminución en el contenido de

tirosina (50%), que interviene en la síntesis de hormonas tiroideas, catecolaminas y melanina y un aumento considerable en aminoácidos esenciales libres como la treonina (29%), isoleucina (12%) y valina (19%), tres aminoácidos claves en el desarrollo infantil (Paolo et al., 2017). La treonina se encarga junto al ácido aspártico de metabolizar grasas que se depositan en órganos como el hígado modulando la obesidad. Esto sugiere que los altos niveles de este aminoácido podrían contribuir en el control del peso y la salud metabólica. Por otro lado, la isoleucina se encarga de regular el azúcar en sangre y los niveles energéticos y, por último, la valina ayuda a prevenir la descomposición del músculo, ya que suministra una cantidad extra de glucosa.

En resumen, el proceso de fermentación de las habas reduce la biodisponibilidad de ciertos aminoácidos, pero de manera simultánea, mejora la liberación de otros aminoácidos esenciales y no esenciales, lo que hace que las habas fermentadas sean un componente dietético muy valioso, principalmente para aquellos niños que presentan problemas de sobrepeso.

3.3 Efecto de la fermentación de las habas sobre la digestibilidad de los carbohidratos.

La glicólisis es la vía metabólica central en la que los carbohidratos se descomponen para producir energía, siendo un parámetro importante en el crecimiento y desarrollo adecuado de los niños, sin embargo, también puede afectar negativamente al aumento de la ganancia de peso. En este estudio, como se ha comentado anteriormente, la presencia de *Pleurotus ostreatus* produce una disminución en los niveles de carbohidratos de las habas, pues el hongo descompone los sustratos alimenticios en componentes más simples como la glucosa y otros azúcares. En relación con la digestibilidad, en la Figura 2 observamos una baja extensión de la glicólisis (26%) en el haba solamente remojada.

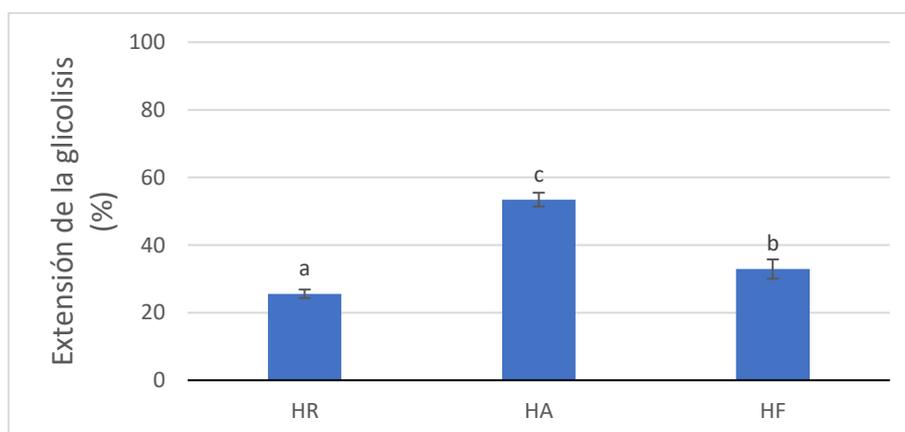


Figura 2. Extensión de la glicólisis (%) de las muestras estudiadas: Habas remojadas (HR), Habas autoclavadas (HA) y Habas fermentadas (HF).

Sin embargo, cuando el haba se somete al procesado del autoclavado, la digestibilidad aumenta a un 54%, debido principalmente a que el proceso térmico promueve la gelatinización/retrogradación del almidón y la inactivación de inhibidores de enzimas favoreciendo su digestibilidad. A pesar de ello, cuando se ingiere el haba fermentada la digestibilidad de los carbohidratos baja al 33%. Zhang et al., (2016) explica como el proceso de fermentación puede alterar los ratios de almidón de rápida adsorción, de lenta adsorción y el almidón resistente, pudiendo afectar así su digestibilidad. Una digestión de los carbohidratos más lenta está asociado a un índice glucémico más bajo lo que está asociado con un menor riesgo de diabetes de tipo II y obesidad.

3.4. Bioaccesibilidad de componentes minoritarios y capacidad antioxidante de las habas.

Se evaluó el contenido de fenoles totales (TPC) y los cambios en la actividad antioxidante durante la digestión de las tres habas estudiadas y cuyos resultados se recogen en la Tabla 3. Las habas son una buena fuente de compuestos fenólicos, capaces de establecer interacciones con las proteínas modificando así su biodisponibilidad. En este estudio, se observa un aumento considerable tanto en el haba remojada como el haba autoclavada (162 y 268% respectivamente), esto puede atribuirse a dos factores: la acción de la pepsina sobre las proteínas fomenta la liberación de polifenoles solubles en agua y el pH ácido de la digestión fomenta la presencia de formas no disociadas de los compuestos fenólicos al reducir interacciones iónicas, lo que facilita su movimiento hacia la fase acuosa (Gallego et al., 2021). Sin embargo, en el haba fermentada la bioaccesibilidad es del 70% dato del cuál existen pocos estudios actualmente. Algo similar ocurre con los antioxidantes, pues tras el autoclavado encontramos una bioaccesibilidad entre 100 y 340% frente a 18-65% de las habas fermentadas. En este caso, algunos autores atribuyen estos cambios a diferencias en la digestión de proteínas, la liberación de aminoácidos y la hidrólisis parcial y desprotonación de los grupos hidroxilo de los fenoles totales durante la digestión. Algunos aminoácidos como la histidina o el triptófano se correlacionan con una alta actividad antioxidante, los aminoácidos aromáticos que presentan un anillo de pirrolidina también mostraron una alta capacidad antioxidante (Zou et al., 2016). Estos aminoácidos se encontraron en menor medida en la digestión de habas fermentadas.

Una correcta absorción de los minerales en los primeros años de vida es esencial para asegurar un crecimiento y salud óptima en niños. Es por ello por lo que se analizó la bioaccesibilidad de calcio, hierro y magnesio, cuyos resultados están detallados en la Tabla 3. Podemos observar un descenso en la bioaccesibilidad del calcio cuando el haba es fermentada con el hongo (del 79 al 27%), mientras que hay un aumento notable en la del magnesio (del 27 al 57%).

Tabla 3. Contenido en minerales (mg/100g en base seca), y contenido en fenoles, antioxidantes (mg CAE, mg TE/100g en base seca) de las muestras tras el proceso de digestión *in vitro*: Habas remojadas (HR), Habas autoclavadas (HA) y Habas fermentadas (HF).

Muestras	Habas remojadas (HR)	Habas autoclavadas (HA)	Habas fermentadas (HF)
<i>Contenido en minerales en la fracción bioaccesible tras la etapa intestinal</i>			
Magnesio (mg/100g b.s)	45,53 ± 1,48 ^a (27,63)	52,30 ± 1,26 ^a (25,14)	82,89 ± 3,68 ^b (57,87)
Calcio (mg/100g b.s)	152,85 ± 1,46 ^a (79,48)	185,91 ± 23,23 ^a (53,58)	43,36 ± 5,47 ^b (27,18)
Hierro (mg/100g b.s)	4,10 ± 0,34 ^a (101,29)	43,36 ± 5,47 ^b (117,50)	2,02 ± 0,30 ^a (56,69)
<i>Fenoles totales y actividad antioxidante en la fracción bioaccesible tras la etapa intestinal</i>			
TPC (mg CAE/ 100g b.s)	8,35 ± 0,42 ^a (162,56)	7,88 ± 0,19 ^a (268,82)	1,91 ± 0,18 ^b (73,09)
DPPH (mg TE/100g b.s)	0,51 ± 0,65 ^a (7,14)	9,43 ± 0,38 ^b (203,23)	1,71 ± 0,44 ^a (60,21)
ABTS (mg TE/100g b.s)	14,35 ± 4,86 ^a (183,04)	10,72 ± 2,37 ^a (342,49)	0,92 ± 0,30 ^b (18,08)
FRAP (mg TE/100g b.s)	4,48 ± 0,12 ^a (82,20)	2,99 ± 0,12 ^a (103,10)	0,93 ± 0,10 ^b (65,49)

Los datos que han sido presentados son valores medios de triplicados. Letras minúsculas diferentes indican que hay diferencias significativas entre las diferentes habas con un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$). Los valores entre paréntesis en contenido mineral y contenido fenólico total representan la bioaccesibilidad (%).

El magnesio se relaciona con la regulación de la señalización de la insulina y la captación celular de la glucosa mediante la insulina, es decir, un déficit de este, estaría relacionado con el desarrollo de diabetes mellitus tipo II (Naseeb et al., 2021). Por otro lado, la baja bioaccesibilidad del calcio favorecería la absorción del magnesio, ya que ambos son competidores y un contenido elevado de calcio reduce la absorción intestinal del magnesio. En el caso del contenido en Hierro, la fermentación de las habas podría promover la síntesis de ferritina, lo que hace que aumente la bioaccesibilidad del hierro (Chawla et al., 2017).

3.5 Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) de las fracciones biodisponibles de haba obtenidas antes y tras la digestión *in vitro*.

El riesgo de hipertensión arterial en niños es de 5 a 7 veces mayor que en los niños de la misma edad con un peso saludable. Las angiotensinas son un conjunto de hormonas peptídicas que causan vasoconstricción y un posterior aumento de la presión arterial y son sintetizadas mediante la acción de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA). La inhibición de la encima ECA es muy importante en la reducción de la presión arterial y, por lo tanto, ayuda a disminuir las complicaciones de hipertensión (Wühl, 2019).

Según los resultados obtenidos en la Figura 3 ni las muestras remojadas ni esterilizadas en autoclave mostraron una capacidad inhibitoria significativa (menos del 10%), sin embargo, la fermentación aumentó significativamente la inhibición de la ECA.

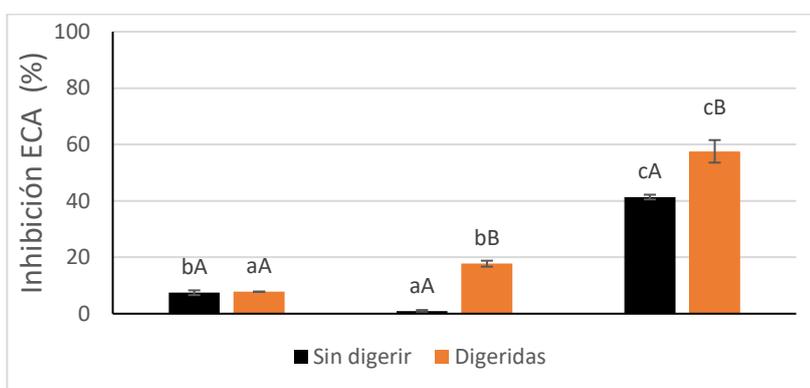


Figura 3: Actividad inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) (%) en Habas remojadas (HR), Habas autoclavadas (HA) y Habas fermentadas (HF) antes y después de la digestión *in vitro*.

Se observa un claro aumento tanto en la inhibición de la ECA en las habas fermentadas (34%) como en la fracción bioaccesible del digerido de las habas fermentadas (49%), lo que puede mejorar el control de la hipertensión y reducir la probabilidad de desarrollar ciertas enfermedades cardiovasculares. Numerosos estudios afirman que, la actividad inhibitoria de ECA corresponde a fracciones de proteínas y péptidos de bajo peso molecular. Además, el hongo *P.ostreatus* junto a todos los hongos *Pleurotus* mostraron inhibición de la ECA debido a su alto contenido proteico (Abdullah et al., 2012).

4. CONCLUSIONES

La fermentación en estado sólido de las habas con *P.ostreatus* mejora significativamente el valor nutricional de las habas aumentando el contenido en proteína total, aminoácidos esenciales y reduciendo el contenido en carbohidratos y taninos. Sin embargo, implica una reducción del contenido total de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. Este proceso también tiene

un impacto positivo en la bioaccesibilidad de aminoácidos esenciales, como es el caso de la treonina, isoleucina y valina, implicados en el desarrollo de niños y adolescentes. Además, la fermentación de este sustrato aumenta la inhibición de la ECA. Por tanto, las habas fermentadas con *Pleurotus ostreatus* podrían jugar un papel clave como ingrediente para el desarrollo de nuevos productos ricos en proteínas enfocados a niños y jóvenes. No obstante, se requiere de más estudios que permitan optimizar el proceso y estudiar los aspectos tecnológicos para la incorporación de este nuevo ingrediente en distintas matrices alimentarias.

5. REFERENCIAS

- Abdullah, N., Ismail, S. M., Aminudin, N., Shuib, A. S., & Lau, B. F. (2012). Evaluation of selected culinary-medicinal mushrooms for antioxidant and ACE inhibitory activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/464238>
- Adamovic, M., Grubic, G., Milenkovic, I., Jovanovic, R, Protic, R., Sretenovic, L., & Stoicevic, L. (1998). The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushrooms and its use in cattle feeding. In *Animal Feed Science Technology* (Vol. 71).
- Akillioğlu, H. G., & Karakaya, S. (2009). Effects of heat treatment and in vitro digestion on the angiotensin converting enzyme inhibitory activity of some legume species. *European Food Research and Technology*, 229(6), 915–921. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1133-x>
- AOAC. (2000). *Official methods of analysis of AOAC International* (17th ed.). Association of Official Analytical Chemists.
- Aranibar, C., Pigni, N. B., Martinez, M., Aguirre, A., Ribotta, P., Wunderlin, D., & Borneo, R. (2018). Utilization of a partially-deoiled chia flour to improve the nutritional and antioxidant properties of wheat pasta. *LWT*, 89, 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.003>
- Barrera, C., Betoret, N., Corell, P., & Fito, P. (2009). Effect of osmotic dehydration on the stabilization of calcium-fortified apple slices (var. Granny Smith): Influence of operating variables on process kinetics and compositional changes. *Journal of Food Engineering*, 92(4), 416–424. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.034>
- Biro, F. M., & Wien, M. (2010). Childhood obesity and adult morbidities. In *American Journal of Clinical Nutrition* (Vol. 91, Issue 5). <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.28701B>
- Caprioli, G., Nzekoue, F. K., Giusti, F., Vittori, S., & Sagratini, G. (2018). Optimization of an extraction method for the simultaneous quantification of sixteen polyphenols in thirty-one pulse samples by using HPLC-MS/MS dynamic-MRM triple quadrupole. *Food Chemistry*, 266, 490–497. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.049>
- Charles S Brennan, M. B. S. M. S. P. (2016). The potential of combining cereals and legumes in the manufacture of extruded products for a healthy lifestyle. *EC Nutrition*, 5(2), 1120–1127.
- Chawla, P., Bhandari, L., Sadh, P. K., & Kaushik, R. (2017). Impact of solid-state fermentation (*aspergillus oryzae*) on functional properties and mineral bioavailability of black-eyed pea

- (vigna unguiculata) seed flour. *Cereal Chemistry*, 94(3), 437–442.
<https://doi.org/10.1094/CCHEM-05-16-0128-R>
- De España, G. (2021). *NATIONAL STRATEGIC PLAN FOR THE REDUCTION OF CHILDHOOD OBESITY (2022-2030) Spain. Executive summary.*
- De Vries-Ten Have, J., Owolabi, A., Steijns, J., Kudla, U., & Melse-Boonstra, A. (2020). Protein intake adequacy among Nigerian infants, children, adolescents and women and protein quality of commonly consumed foods. In *Nutrition Research Reviews* (Vol. 33, Issue 1, pp. 102–120). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0954422419000222>
- Downey, M. O., & Hanlin, R. L. (2010). Comparison of Ethanol and Acetone Mixtures for Extraction of Condensed Tannin from Grape Skin. In *J. Enol. Vitic* (Vol. 31, Issue 2).
- Dussimon, K. (2022, July 29). *These Five Trends Will Redefine Global Snacks to 2027.*
<https://www.euromonitor.com/article/these-five-trends-will-redefine-global-snacks-to-2027>.
- G. Grant. (1991). *Toxic Substances in Crop Plants: Vol. 1st Edition* (C. M. D. J. H. D. J P Felix D’Mello, Ed.; Cambridge).
- Gallego, M., Arnal, M., Barat, J. M., & Talens, P. (2021). Effect of cooking on protein digestion and antioxidant activity of different legume pastes. *Foods*, 10(1).
<https://doi.org/10.3390/foods10010047>
- Hammarqvist, F., Angsten, G., Meurling, S., Andersson, K., & Wernerman, J. (2010). Age-related changes of muscle and plasma amino acids in healthy children. *Amino Acids*, 39(2), 359–366. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0446-1>
- Hernández-Olivas, E., Asensio-Grau, A., Calvo-Lerma, J., García-Hernández, J., Heredia, A., & Andrés, A. (2022). Content and bioaccessibility of bioactive compounds with potential benefits for macular health in tiger nut products. *Food Bioscience*, 49.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101879>
- Hernández-Olivas, E., Muñoz-Pina, S., Andrés, A., & Heredia, A. (2021). Age-related gastrointestinal alterations of legumes and cereal grains digestibility. *Food Bioscience*, 41.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101027>
- Hernández-Olivas, E., Muñoz-Pina, S., García-Hernández, J., Andrés, A., & Heredia, A. (2022). Impact of common gastrointestinal disorders in elderly on in vitro meat protein digestibility and related properties. *Food Bioscience*, 46.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101560>
- J. A. Pineda-Insuasti, L. B. R.-S. and C. P. S.-A. (2014). *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 48, 13–23.
- Lee, T. H., Lee, C. H., Azmi, N. A., Liew, R. K., Hamdan, N., Wong, S. L., & Ong, P. Y. (2022). Amino acid determination by HPLC combined with multivariate approach for geographical classification of Malaysian Edible Bird’s Nest. *Journal of Food Composition and Analysis*, 107. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104399>
- Li, L., Cao, X., Huang, J., Zhang, T., Wu, Q., Xiang, P., Shen, C., Zou, L., Li, J., & Li, Q. (2024). Effect of *Pleurotus eryngii* mycelial fermentation on the composition and antioxidant

- properties of tartary buckwheat. *Heliyon*, e25980.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25980>
- Li, L., Zhang, Q., Yuan, X., Yang, H., Qin, S., Hong, L., Pu, L., Li, L., Zhang, P., & Zhang, J. (2024). Study of the molecular structure of proteins in fermented Maize-Soybean meal-based rations based on FTIR spectroscopy. *Food Chemistry*, 441.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138310>
- Maggi, S., Rogoli, D., & Ecartot, F. (2021). Healthy aging in the context of the Mediterranean diet–health–environment trilemma. *Aging and Health Research*, 1(2), 100015.
<https://doi.org/10.1016/j.ahr.2021.100015>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Maclerzanka, A., MacKie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Muzquiz, M., Cuadrado, C., Pedrosa, M. M., & Burbano, C. (2004). *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds and oilseeds*.
<https://www.researchgate.net/publication/235635489>
- Naseeb, M., Bruneau, M. L., Milliron, B. J., Sukumar, D., Foster, G. D., Smith, S. A., & Volpe, S. L. (2021). Changes in Dietary Magnesium Intake and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in Middle School Students: Using Data from the HEALTHY Study. *Journal of Nutrition*, 151(11), 3442–3449. <https://doi.org/10.1093/jn/nxab272>
- OMS. (2022). *WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative (COSI)*.
<https://www.who.int/europe/publications/i/item/WHO-EURO-2022-6594-46360-67071>
- Paolo, J., Morales, Z., Juvenal, W., Pizarro, Z., Iván, V., Macías, V., Avalos Moreno, E., Aminoácidos, L., El, E., & Humano, C. (2017). *Editorial Saberes del Conocimiento*. 1(5), 379–391. <https://doi.org/10.26820/recimundo/1.5.2017.379-391>
- Rousta, N., Larsson, K., Fristedt, R., Undeland, I., Agnihotri, S., & Taherzadeh, M. J. (2022). Production of fungal biomass from oat flour for the use as a nutritious food source. *NFS Journal*, 29, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2022.09.001>
- Sánchez-García, J., Muñoz-Pina, S., García-Hernández, J., Heredia, A., & Andrés, A. (2023). Impact of Air-Drying Temperature on Antioxidant Properties and ACE-Inhibiting Activity of Fungal Fermented Lentil Flour. *Foods*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/foods12050999>
- Sansano, M., Juan-Borrás, M., Escriche, I., Andrés, A., & Heredia, A. (2015). Effect of pretreatments and air-frying, a novel technology, on acrylamide generation in fried potatoes. *Journal of Food Science*, 80(5), T1120–T1128. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12843>
- Sinsabaugh, R. L. (2010). Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. In *Soil Biology and Biochemistry* (Vol. 42, Issue 3, pp. 391–404).
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.10.014>

- Sousa, R., Recio, I., Heimo, D., Dubois, S., Moughan, P. J., Hodgkinson, S. M., Portmann, R., & Egger, L. (2023). In vitro digestibility of dietary proteins and in vitro DIAAS analytical workflow based on the INFOGEST static protocol and its validation with in vivo data. *Food Chemistry*, 404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134720>
- Stagnari, F., Maggio, A., Galieni, A., & Pisante, M. (2017). Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. In *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* (Vol. 4, Issue 1). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0085-1>
- Starzyńska-Janiszewska, A., Duliński, R., & Stodolak, B. (2020). Fermentation with Edible Rhizopus Strains to Enhance the Bioactive Potential of Hull-Less Pumpkin Oil Cake. *Molecules*, 25(24). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245782>
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- Torino, M. I., Limón, R. I., Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C., & Frias, J. (2013). Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry*, 136(2), 1030–1037. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.015>
- UNICEF. (2019). *Prevention of Overweight and Obesity in Children and Adolescents: UNICEF Programming Guidance*.
- Verni, M., Verardo, V., & Rizzello, C. G. (2019). How fermentation affects the antioxidant properties of cereals and legumes. In *Foods* (Vol. 8, Issue 9). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/foods8090362>
- Weihe, P., Spielmann, J., Kielstein, H., Henning-Klusmann, J., & Weihrauch-Blüher, S. (2020). Childhood Obesity and Cancer Risk in Adulthood. In *Current obesity reports* (Vol. 9, Issue 3, pp. 204–212). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1007/s13679-020-00387-w>
- Weihrauch-Blüher, S., Schwarz, P., & Klusmann, J. H. (2019). Childhood obesity: increased risk for cardiometabolic disease and cancer in adulthood. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 92, 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.12.001>
- Wühl, E. (2019). Hypertension in childhood obesity. In *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics* (Vol. 108, Issue 1, pp. 37–43). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/apa.14551>
- Zhang, T., Li, X., Chen, L., & Situ, W. (2016). Digestibility and structural changes of waxy rice starch during the fermentation process for waxy rice vinasse. *Food Hydrocolloids*, 57, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.004>
- Zou, T. Bin, He, T. P., Li, H. Bin, Tang, H. W., & Xia, E. Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. In *Molecules* (Vol. 21, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules21010072>