



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Efecto del grado de hidrólisis proteica sobre las
propiedades nutricionales y bioactivas de harinas de frijol
negro hidrolizadas con extracto de subproductos de la piña.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Flores Prado, Luz de Paz

Tutor/a: Talens Oliag, Pau

Director/a Experimental: Arnal Salinas, Milagros

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

Efecto del grado de hidrólisis proteica sobre las propiedades nutricionales y bioactivas de harinas de frijol negro hidrolizadas con extracto de subproductos de la piña.

Resumen:

La hidrólisis enzimática de las proteínas puede ser una alternativa para conseguir una mejora en las propiedades nutricionales y bioactivas de las legumbres. Para ello, se suelen utilizar enzimas puras como la bromelina, la cual es extraída de la piña. Sin embargo, se ha visto que extractos procedentes de sus subproductos también tienen una actividad proteolítica significativa pudiendo ser una alternativa más sostenible y asequible. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la hidrólisis proteica sobre las propiedades nutricionales y bioactivas de harinas de frijol negro hidrolizadas con un extracto de la corona de la piña rico en bromelina. Para ello, se hidrolizaron harinas de frijol negro con un extracto acuoso de la corona de la piña y con una disolución de bromelina comercial durante 2, 4 y 6 h consiguiéndose grados de hidrólisis del 5,2, 8,1 y 10,4 % y del 8,2, 13,8 y 14,8 %, respectivamente. Se estudió como afectaba el tipo y grado de hidrólisis, y el tiempo de incubación, en el contenido de antinutrientes (ácido fítico, inhibidores de tripsina, compuestos fenólicos totales y taninos), la digestibilidad proteica, la bioaccesibilidad del hierro, la actividad antioxidante y la actividad quelante del hierro. Los resultados mostraron que, a medida que aumentó el grado de hidrólisis, aumentó el contenido en compuestos fenólicos totales y taninos, pero prácticamente no afectó al contenido de ácido fítico e inhibidores de tripsina. Sin embargo, el extracto de la corona de la piña aumentó el contenido de inhibidores de tripsina de las harinas. En general, la digestibilidad proteica de las harinas, así como la bioaccesibilidad del hierro no se vieron afectadas por el grado de hidrólisis. Por último, la hidrólisis mejoró la actividad antioxidante de las harinas, pero no modificó la actividad quelante del hierro, aunque si se mostró una menor actividad quelante en las harinas hidrolizadas con el extracto.

Palabras clave: piña, bromelina, frijol negro, grado de hidrólisis, harinas

Autora: Luz de Paz Flores Prado

Tutor: Pau Talens Oliag

Tutora experimental: Milagros Arnal Salinas

Valencia, junio 2024

Effect of protein hydrolysis degree on the nutritional and bioactive properties of black bean flours hydrolyzed with pineapple by-product extract.

Abstract:

Enzymatic hydrolysis of proteins can be an alternative to achieve an improvement in the nutritional and bioactive properties of pulses. Pure enzymes such as bromelain, which is extracted from pineapple, are often used for this purpose. However, extracts from pineapple by-products have also been shown to have significant proteolytic activity and may be a more sustainable and affordable alternative. The aim of this work was to evaluate the effect of protein hydrolysis on the nutritional and bioactive properties of black bean meals hydrolysed with a bromelain-rich pineapple crown extract. For this purpose, black bean meals were hydrolysed with an aqueous pineapple crown extract and a commercial bromelain solution for 2, 4 and 6 h, achieving hydrolysis rates of 5.2, 8.1 and 10.4 % and 8.2, 13.8 and 14.8 %, respectively. The effect of the type and degree of hydrolysis and incubation time on anti-nutrient content (phytic acid, trypsin inhibitors, total phenolic compounds and tannins), protein digestibility, iron bioaccessibility, antioxidant activity and iron chelating activity was studied. The results showed that as the degree of hydrolysis increased, the content of total phenolic compounds and tannins increased, but practically did not affect the phytic acid and trypsin inhibitor content. However, pineapple crown extract increased the trypsin inhibitor content of the meals. In general, the protein digestibility of the meals as well as the bioaccessibility of iron were not affected by the degree of hydrolysis. Finally, hydrolysis improved the antioxidant activity of the flours, but did not modify the iron chelating activity, although a lower chelating activity was shown in the flours hydrolysed with the extract.

Keywords: pineapple, bromelain, black bean, degree of hydrolysis, flours

Autor: Luz de Paz Flores Prado

Supervisor: Pau Talens Oliag

Experimental supervisor: Milagros Arnal Salinas

Valencia, June 2024

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar a mi tutora experimental, Mila Arnal, por su gran dedicación, paciencia y apoyo en tantas horas de laboratorio.

También quiero expresar mi gratitud a Pau Talens, por ofrecerme esta oportunidad y, en particular, por su implicación en mi desarrollo académico y su comprensión constante.

Asimismo, los autores agradecen al programa ADSIDEO 2022 del Centro de Cooperación y Desarrollo de la Universitat Politècnica de València.

Especialmente, quiero mencionar a mis amigos y darles las gracias por estos 4 años inolvidables que tanto me han marcado tanto a nivel personal como profesional, pues sin su ayuda, apoyo y ánimo constante no habría sido lo mismo.

Finalmente, agradecer a mi familia, quienes siempre me han ayudado y apoyado en mi desarrollo personal y académico, quienes siempre me han impulsado a dar lo mejor de mí, y, sobre todo, por enseñarme la lección más valiosa en la vida: la importancia de luchar por mis sueños y no rendirme.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Las legumbres y el caso particular del frijol negro	1
1.2. Harina de legumbres	2
1.3. La hidrólisis enzimática como alternativa para mejorar la calidad nutricional de las proteínas de legumbres	3
1.4. Enzimas proteolíticas, la bromelina	4
1.5. Contextualización del trabajo.....	5
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	6
2.1. Objetivo general	6
2.2. Objetivos específicos.....	6
2.3. Plan de trabajo	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1. Materias primas y reactivos	7
3.2. Obtención del extracto rico en bromelina.....	7
3.3. Obtención de las harinas hidrolizadas de frijol negro.....	8
3.4. Determinación del grado de hidrólisis proteica de las harinas hidrolizadas de frijol negro	8
3.4.1. Determinación del número total de enlaces peptídicos	8
3.4.2. Determinación de enlaces peptídicos hidrolizados.....	8
3.4.3. Método del TNBS	8
3.5. Determinación del contenido de antinutrientes en las harinas hidrolizadas de frijol negro	9
3.5.1. Ácido fítico	9
3.5.2. Inhibidores de tripsina.....	9
3.5.3. Compuestos fenólicos totales	10
3.5.4. Taninos	10
3.6. Determinación de la digestibilidad proteica de las harinas hidrolizadas de frijol negro.....	10
3.6.1. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	11
3.7. Determinación de la bioaccesibilidad del hierro de las harinas hidrolizadas de frijol negro	11
3.8. Determinación de la actividad antioxidante de las harinas hidrolizadas de frijol negro.....	12
3.8.1. Método DPPH.....	12
3.8.2. Método ABTS	12
3.8.3. Método FRAP	12
3.9. Determinación de la actividad quelante del hierro de las harinas hidrolizadas de frijol negro	13

3.10.	Análisis estadístico	13
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1.	Grado de hidrólisis de las harinas hidrolizadas de frijol negro	14
4.2.	Contenido de antinutrientes en las harinas hidrolizadas de frijol negro.....	15
4.3.	Digestibilidad proteica de las harinas hidrolizadas de frijol negro	18
4.4.	Bioaccesibilidad del hierro de las harinas hidrolizadas de frijol negro.....	19
4.5.	Actividad antioxidante de las harinas hidrolizadas de frijol negro.....	20
4.6.	Actividad quelante del hierro de las harinas hidrolizadas de frijol negro	23
5.	CONCLUSIONES	25
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	26

Índice figuras

Figura 1. Grado de hidrólisis de las harinas de frijol negro hidrolizadas con extracto de la corona de la piña y con bromelina comercial.....	14
Figura 2. Contenido de antinutrientes de las harinas de frijol negro control (agua) e hidrolizadas con extracto de la corona de la piña y con bromelina comercial. Contenido de A) ácido fítico, B) inhibidores de tripsina, C) compuestos fenólicos totales, y D) taninos.....	16
Figura 3. Grado de hidrólisis proteica de las harinas de frijol negro control (agua) e hidrolizadas con extracto de la corona de la piña y con bromelina comercial tras la digestión gastrointestinal in vitro.	19
Figura 4. Bioaccesibilidad del hierro de las harinas de frijol negro control (agua) e hidrolizadas con extracto de la corona de la piña y con bromelina comercial.....	20
Figura 5. Actividad antioxidante de las harinas de frijol negro control (agua) e hidrolizadas con extracto de la corona de la piña y con bromelina comercial determinada con el método DPPH (A), con el método ABTS (B) y con el método FRAP (C).....	21
Figura 6. Actividad quelante del hierro de las harinas de frijol negro control (agua) e hidrolizadas con extracto de la corona de la piña y con bromelina comercial.....	23

Índice tablas

Tabla 1. Composición nutricional de macronutrientes del frijol negro.....	2
Tabla 2. Composición nutricional de minerales del frijol negro.....	2
Tabla 3. Composición nutricional de vitaminas del frijol negro	2

Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030 al Trabajo de Final de Grado

A. Indicar el grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza		X		
ODS 2. Hambre cero	X			
ODS 3. Salud y bienestar	X			
ODS 4. Educación de calidad				X
ODS 5. Igualdad de género			X	
ODS 6. Agua limpia y saneamiento				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico		X		
ODS 9. Industria, innovación e infraestructura				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				X
ODS 12. Producción y consumo responsables	X			
ODS 13. Acción por el clima	X			
ODS 14. Vida submarina				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres		X		
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X
ODS 17. Alianza para lograr objetivos				X

B. Describir brevemente la alineación del TFG con los ODS, marcados en la tabla anterior, con un grado alto.

El presente TFG muestra una estrecha relación con el ODS 2 (Hambre cero) debido a que el estudio está enfocado en un contexto rural para poner en valor el cultivo del frijol negro y promover la reutilización de los subproductos de la piña.

Asimismo, con dicho estudio se promueve el consumo de alimentos saludables, alineándose de esta forma con el ODS 3 (Salud y bienestar). Esto se debe a que, a través del procesamiento llevado a cabo y de una presentación alternativa para el consumo de frijol negro como es la harina, se pretende favorecer el consumo de legumbres. Éstas suponen un elemento esencial en la dieta por ser una fuente de nutrientes además de ser una alternativa económica a la proteína animal proporcionando una proteína completa y asequible al combinarse con cereales.

Por otra parte, se contribuye al ODS 12 (Producción y consumo responsables) pues al promover el cultivo del frijol, realmente se promueve un cultivo local en el contexto rural medioambientalmente sostenible y respetuoso. De igual forma se contribuye a la economía circular a través de la revalorización de subproductos en el caso de la piña.

Finalmente, el ODS 13 (Acción por el clima) también se tiene presente al considerar los impactos negativos en el ambiente atribuido a los fertilizantes sintéticos, pues se reduce la necesidad de su uso gracias a la capacidad de las legumbres de fijar el nitrógeno atmosférico.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las legumbres y el caso particular del frijol negro

Las legumbres son una especie vegetal perteneciente a la familia *Leguminosae*, o también conocida como *Fabaceae* (FAO, 2016). Se caracterizan por ser una fuente rica de proteínas y aminoácidos esenciales siendo nutricionalmente muy completas cuando se complementan con cereales. Esto se debe a que la proteína procedente de las legumbres es deficiente en metionina y cisteína, pero rica en lisina, mientras que la de los cereales son ricas en esos aminoácidos azufrados, pero tienen poca lisina, consiguiendo de esta forma una complementariedad en cuanto a su contenido de aminoácidos esenciales (Staniak *et al.*, 2014). Asimismo, su composición se caracteriza por su aporte de hidratos de carbono complejos, micronutrientes, fibra alimentaria, y su bajo contenido en grasas (Amoah *et al.*, 2023). No obstante, en general, las proteínas de las legumbres son menos digestibles que las proteínas animales debido a su estructura y su contenido en antinutrientes, como los inhibidores de tripsina, los taninos o el ácido fítico (Bessada *et al.*, 2019), que dificultan o impiden la absorción de los nutrientes.

Por su especial valor nutricional, el consumo de legumbres se asocia a numerosas propiedades beneficiosas para la salud (Ofuya y Akhidue, 2005). Por ejemplo, contribuyen a la prevención y/o tratamiento de enfermedades no contagiosas como la diabetes, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Vergara-Castañeda *et al.*, 2013).

Asimismo, parte de sus propiedades beneficiosas se deben a la generación de péptidos bioactivos de pequeño tamaño durante la hidrólisis de las proteínas (Moayedí *et al.*, 2018) producida durante la digestión gastrointestinal (Hajfathalian *et al.*, 2018). De esta forma, dichos péptidos bioactivos pueden ejercer alguna función específica como, por ejemplo, actividad antioxidante y/o actividad quelante que dependerá de su tamaño y la composición y secuencia de los aminoácidos (Arnal Salinas, 2020).

En cuanto al consumo de legumbres en España, tal y como expone el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación en el Informe del consumo de alimentación en España (MAPA, 2022), en 2022 se consumieron un total de 154372,58 toneladas de legumbres, siendo el consumo per cápita de 3,34 kg (MAPA, 2022).

Por otra parte, en cuanto a la producción, a escala mundial casi se alcanzaron los 89 millones de toneladas métricas en 2021, suponiendo una disminución aproximada de un millón de toneladas respecto al año 2020, pero aumentó en un 20 % en comparación con la producción de 2010 (FAO, 2023). En este aspecto, se destaca que el 60 % de dicha producción mundial corresponde a la producción de judías secas, resaltando India, Brasil, EEUU, China y México como principales productores (MAPA, 2021).

De esta forma, concretamente se destaca México por su estrecha relación con los frijoles, pues a parte de resultar un producto estratégico a nivel económico con una producción anual de más de 100 mil toneladas, también resulta ser esencial por contribuir a la identidad nacional al percibirse como un componente fundamental en la dieta básica de México por la tradición de su cultivo desde hace 8000 años en las culturas indígenas (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural del Gobierno de México, 2020). Durante su domesticación surgieron un gran número de variedades como por

ejemplo el frijol negro, que se emplea especialmente en la cocina mexicana (FAO, 2016) y aporta un contenido importante en proteína (Graham y Ranalli, 1997). Además, aportan minerales y fibra, aunque también se valoran positivamente por ser ricas en algunas vitaminas (Celmeli *et al.*, 2018). En las Tablas 1, 2 y 3 se especifica su composición completa en cuanto al contenido en macronutrientes, minerales y vitaminas (Moreiras *et al.*, 2013).

Tabla 1. Composición nutricional de macronutrientes del frijol negro

Agua (g)	Energía (kcal)	Proteínas (g)	Grasas (g)	Hidratos de carbono (g)	Fibra alimentaria (g)
1,7	364	22,7	1,6	55,6	18,4

Fuente: Tablas de composición de alimentos (Moreiras *et al.*, 2023)

Tabla 2. Composición nutricional de minerales del frijol negro

Calcio (mg)	Hierro (mg)	Magnesio (mg)	Zinc (mg)	Sodio (mg)	Potasio (mg)	Fósforo (mg)	Selenio (µg)
134	7,1	138	2,6	8	1464	415	-

Fuente: Tablas de composición de alimentos (Moreiras *et al.*, 2023)

Tabla 3. Composición nutricional de vitaminas del frijol negro

Vit B1 (mg)	Vit B2 (mg)	Eq de Niacina (mg)	Vit B6 (mg)	Folato (µg)	Vit C (mg)	Vit A: Eg de retinol (µg)	Vit E (mg)
0,47	0,15	2,09	0,53	463	1	0	-

Fuente: Tablas de composición de alimentos (Moreiras *et al.*, 2023)

1.2. Harina de legumbres

Tal y como destaca la FAO (2016), existe actualmente una doble problemática nutricional, pues existe el desafío de alcanzar un equilibrio nutricional considerando los casos de sobreconsumo, que afectan a una tendencia creciente de obesidad, y el creciente número de personas que sufren carencias alimenticias debido al hambre crónica. Ante esta situación, se considera a las legumbres la solución de ambos problemas expuestos por su papel esencial en una dieta saludable (FAO, 2016).

A pesar de las beneficiosas características nutricionales de las legumbres, en la sociedad española existe una tendencia decreciente en el consumo en los hogares, tal y como se registra en el Panel de Consumo de Alimentos (PCA) y la Encuesta Nacional de Nutrición y Alimentación (ENNA) debido posiblemente a un progresivo abandono de alimentos básicos en la evolución de los hábitos alimentarios de la población española (Enjamio Perales *et al.*, 2017). De esta forma, se plantea la harina de legumbres como una alternativa a su forma habitual de consumo proporcionando facilidad de consumo y una diversificación de la presentación de dicha materia prima con la finalidad de favorecer y estimular el posicionamiento de dicho alimento en la dieta.

Para obtener la harina, las legumbres se limpian, se clasifican y se secan para reducir la humedad hasta el nivel requerido (Campos-Vega *et al.*, 2018). A continuación, estas se pueden moler directamente y tamizar, o se pueden realizar algunos pretratamientos para mejorar sus propiedades nutricionales, funcionales y/u organolépticas. Por ejemplo, el remojo es uno de los más utilizados ya que reduce el contenido de algunos antinutrientes y además reduce el tiempo de cocción (Arnal *et al.*, 2023). Otro de los más comunes es la cocción ya que consigue desnaturalizar parte de los antinutrientes de naturaleza proteica, aumenta la digestibilidad de las proteínas y el almidón, y produce cambios en algunas de las propiedades fisicoquímicas y/o tecno-funcionales (Arnal *et al.*, 2023). En este sentido, la hidrólisis enzimática de las proteínas de las legumbres se presenta como una alternativa para mejorar las propiedades nutricionales y tecno-funcionales (Mookerjee y Tanaka, 2023; Gouseti *et al.*, 2023).

1.3. La hidrólisis enzimática como alternativa para mejorar la calidad nutricional de las proteínas de legumbres

En la industria alimentaria se utiliza ampliamente el proceso de la hidrólisis (Wang *et al.*, 2011). Concretamente para la hidrólisis de proteínas destaca la hidrólisis ácida, la cual se basa en una hidrólisis química, y la hidrólisis enzimática (Sun, 2011). A partir de ciertos estudios, se considera que la hidrólisis ácida permite obtener mayor grado de hidrólisis de la proteína en un tiempo más corto (Wisuthiphaet *et al.*, 2015), mientras que la hidrólisis enzimática supone una hidrólisis más segura y controlada, a través de reacciones más específicas consiguiendo de esta forma un producto más uniforme (Sun, 2011; Campbell *et al.*, 1996). Y aunque la hidrólisis enzimática presenta dificultades en la cinética (Paquot y Thonart, 1986), la hidrólisis ácida genera productos secundarios tóxicos como clorhidrinas (Sun, 2011). Es por dicho motivo que el método más apropiado depende del caso, considerando en cada situación el sustrato y los productos a conseguir (Paquot y Thonart, 1986), pues, entre ambas hidrólisis, existe una diferencia significativa en la selectividad del producto (Wang *et al.*, 2011).

La hidrólisis enzimática de las proteínas tiene muchos efectos debido a las roturas de los enlaces, produciendo de esta forma unos cambios en las características de la proteína (Benítez *et al.*, 2008). Por una parte, la hidrólisis afecta a diversas propiedades moleculares que se ven alteradas y, como consecuencia, afecta a las propiedades funcionales (Benítez *et al.*, 2008). Éstas pueden ser del tipo tecno-funcionales y del tipo bio-funcionales, clasificándose estas últimas según si se enfocan en propiedades nutricionales, como sería la digestibilidad, o en fisiológicas, como la bioactividad o la biodisponibilidad (Benítez *et al.*, 2008).

A pesar del gran potencial nutricional que tienen las legumbres, existen diferentes factores propios de las legumbres como su baja digestibilidad proteica o la presencia de compuestos antinutricionales que limitan los beneficios de consumo (R. Y. Khattab *et al.*, 2009). Es por este motivo que existen numerosos estudios con la finalidad de evaluar la posibilidad de mejorar su calidad nutricional mediante el procesado de las legumbres (el-Adawy *et al.*, 2000; Avilés-Gaxiola *et al.*, 2018; Drulyte y Orlie, 2019). De esta forma, existe una numerosa gama de productos diferentes provenientes de dicha materia prima a partir de una gran variedad de pretratamientos que mejoran las

características consiguiendo un aporte beneficioso en la salud de los consumidores (Campos-Vega *et al.*, 2018).

Asimismo, el efecto de la hidrólisis enzimática depende del grado de hidrólisis alcanzado, diferenciándose una hidrólisis limitada, con un menor grado de hidrólisis, de una hidrólisis extensiva, empleando un umbral del 10 % (Gouseti *et al.*, 2023). De esta forma, con una hidrólisis extensiva se obtienen péptidos pequeños solubles pero con una pérdida de estructura provocando consecuentemente propiedades funcionales limitadas; mientras que con una hidrólisis limitada se consigue una mejora en factores nutricionales como la digestibilidad proteica *in vitro* corregida con la puntuación de aminoácidos, una mejora en propiedades funcionales como la actividad emulsionante, y una reducción de factores antinutricionales como el ácido fítico o los inhibidores de tripsina (Mookerjee y Tanaka, 2023).

Finalmente, el efecto de la hidrólisis enzimática en las proteínas ha sido estudiada por numerosos autores. Como ejemplos, Zheng *et al.* (2020) hidrolizaron proteína de frijol mungo con ficina y bromelina y aumentó la actividad eliminadora de radicales DPPH, relacionado con la capacidad antioxidante, y la actividad quelante de iones metálicos. Asimismo, Konieczny *et al.* (2020) hidrolizaron proteína de guisante con tripsina, savinasa y papaína disminuyendo el contenido en taninos y fenoles, y la actividad de los inhibidores de tripsina y quimotripsina.

1.4. Enzimas proteolíticas, la bromelina

El tratamiento enzimático basado en enzimas proteolíticas provoca la hidrólisis enzimática de las proteínas responsable de un cambio en su estructura con la consecuente variación de las características y propiedades de ésta (Hartley, 1960).

La utilización de enzimas en la industria alimentaria tiene un amplio número de aplicaciones y estas pueden ser de origen animal, microbiano o vegetal. Entre las enzimas con origen animal se encuentran la tripsina y la pepsina (Gustavo *et al.*, 2022). En cuanto a las enzimas microbianas, las cuales presentan diversas ventajas como la facilidad de cultivo, eficiencia y estabilidad (Mehta y Sehgal, 2019), se puede destacar la alcalasa (Gustavo *et al.*, 2022). Finalmente, se encuentran las enzimas de origen vegetal en la que se puede encontrar la papaína, usualmente obtenida de la papaya (*Carica papaya*) y con diversas aplicaciones en la industria cárnica, la industria láctea, cervecera y panadera (Fernández-Lucas *et al.*, 2017), y la bromelina, una cisteína proteasa obtenida especialmente a partir de la piña (Arshad *et al.*, 2014). Comparando las enzimas, destacan las enzimas obtenidas de vegetales debido al bajo coste de producción pudiendo por este motivo ser conveniente su aplicación, tal y como se declara en el estudio de (David Troncoso *et al.*, 2022).

Concretamente, al considerar la piña, en su extracto crudo se encuentran varias proteasas, siendo la más activa y frecuente la bromelina y, posteriormente, la ananaína (Tacias-Pascacio *et al.*, 2023). Es por este motivo por el que el término general "Bromelina" puede describir el extracto crudo con actividad proteasa obtenido de las hojas, cáscara, tallo o fruto de plantas de la familia *Bromeliaceae* (Pang *et al.*, 2020), dependiendo la actividad hidrolítica del órgano de la planta empleado (Kaur *et al.*, 2015), teniendo el tallo de la piña mayor actividad enzimática (Gautam *et al.*, 2010). A partir de

dicho origen, se plantea la posibilidad de obtener la bromelina de los desechos de la piña consiguiendo, de esta forma, promover la conversión de desechos alimentarios en subproductos, siendo de interés éstos por ser una alternativa sostenible a través de estrategias de purificación.

1.5. Contextualización del trabajo

El trabajo está enmarcado dentro del proyecto “Desarrollo sostenible de harinas mejoradas de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) de la región de las Altas Montañas del Estado de Veracruz, México” financiado por el programa ADSIDEO del Centro de Cooperación y Desarrollo de la Universitat Politècnica de València. Dicho programa tiene como objetivo fomentar la investigación en temáticas relevantes para el desarrollo humano y cooperación internacional al desarrollo, con el fin de abordar disparidades en los países más desfavorecidos.

El objetivo principal del proyecto es la obtención de un producto basado en harina de frijol negro con propiedades nutritivas mejoradas mediante el empleo de la enzima bromelina, obtenida de forma sostenible a partir de residuos agroindustriales de la piña, y enfocado a contribuir a la mejora de la calidad de vida de sus habitantes con un gran impacto en la nutrición de las comunidades rurales. Asimismo, también tiene como objetivo contribuir de manera significativa con los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) en la región de las Altas Montañas de Veracruz, México.

Promover el cultivo del frijol negro y la reutilización de los subproductos de la piña en áreas rurales contribuirá a los ODS 1 (reducción de la pobreza) y ODS 2 (hambre cero) mediante el fortalecimiento agrícola. Además, se fomentará el consumo de alimentos saludables, ya que las legumbres son ricas en nutrientes y son una excelente fuente de proteína mucho más económica que la proteína de origen animal, ya que, combinadas con cereales, proporcionan una proteína completa y accesible, apoyando el ODS 3 (salud y bienestar). El desarrollo agrícola beneficiará a pequeños agricultores, mujeres, niños y jóvenes, impulsando el ODS 5 (igualdad de género) y el ODS 8 (trabajo digno y crecimiento económico). El cultivo del frijol, cultivo respetuoso con el medio ambiente, y el uso de subproductos de la piña, se alinean con el ODS 12 (consumo y producción sostenibles). Por último, las legumbres fijan el nitrógeno atmosférico, reduciendo la necesidad de fertilizantes sintéticos, lo que contribuye al ODS 13 (acción por el clima) y ODS 15 (vida de ecosistemas terrestres).

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. Objetivo general

El objetivo general del trabajo fue evaluar el efecto de la hidrólisis proteica sobre las propiedades nutricionales y bioactivas de harinas de frijol hidrolizadas con un extracto de la corona de la piña rico en bromelina.

2.2. Objetivos específicos

Para alcanzar este objetivo general, se abordaron diferentes objetivos específicos:

- Evaluar el efecto del grado de hidrólisis proteica sobre el contenido en antinutrientes.
- Evaluar el efecto del grado de hidrólisis proteica sobre la digestibilidad proteica de las harinas.
- Evaluar el efecto del grado de hidrólisis proteica sobre la bioaccesibilidad del hierro de las harinas.
- Evaluar el efecto del grado de hidrólisis proteica sobre la actividad antioxidante y quelante de hierro de las harinas.
- Comparar los resultados obtenidos a partir del extracto rico en bromelina de la corona de la piña con la utilización de bromelina comercial con la misma actividad enzimática.

2.3. Plan de trabajo

El plan de trabajo para conseguir los objetivos propuestos fue el siguiente:

- Obtención del extracto de bromelina a partir de la corona de las piñas y medida de su actividad enzimática.
- Obtención de las harinas hidrolizadas de frijol negro con el extracto rico en bromelina a partir de la corona de la piña.
- Obtención de las harinas hidrolizadas de frijol negro con bromelina comercial con la misma actividad enzimática que el extracto.
- Obtención de las harinas de frijol negro control.
- Determinación del grado de hidrólisis proteica de las harinas hidrolizadas de frijol negro.
- Determinación del contenido en antinutrientes de las harinas de frijol negro control e hidrolizadas: ácido fítico, inhibidores tripsina, compuestos fenólicos totales, y taninos.
- Determinación de la digestibilidad proteica de las harinas de frijol negro control e hidrolizadas.
- Determinación de la bioaccesibilidad del hierro de las harinas de frijol negro control e hidrolizadas.
- Determinación de la actividad antioxidante de las harinas de frijol negro control e hidrolizadas.
- Determinación de la actividad quelante del hierro de las harinas de frijol negro control e hidrolizadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materias primas y reactivos

Para la elaboración de la harina se emplearon frijoles negros (*Phaseolus vulgaris*) de origen mexicano adquiridos en una tienda online. Estas harinas se hidrolizaron con un extracto rico en bromelina procedente de coronas de piñas (*Ananas comosus*) adquiridas en el supermercado Alcampo (Alboraya, Valencia, España) y con una disolución de bromelina 2000 de Cygyc Biocon, S.L. (Les Franqueses del Vallès, Barcelona, España).

Para la digestión gastrointestinal *in vitro* se empleó α -amilasa pancreática porcina, pancreatina de páncreas bovino, pepsina de mucosa gástrica porcina y extracto de bilis bovino de Sigma Aldrich, Co. (St Louis, MO, USA); y cloruro de potasio, cloruro de sodio, cloruro de calcio dihidratado, cloruro de magnesio hexahidratado, fosfato monopotásico, bicarbonato de sodio y carbonato de amonio de Scharlau Chemie, S.A. (Sentmenat, Barcelona, España).

Los reactivos utilizados para las distintas determinaciones fueron los siguientes: ácido 5-sulfosalicílico dihidratado, carbonato de sodio, ácido tánico, ácido fítico, N-benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), tripsina de páncreas bovino, ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS), L-leucina, dodecilsulfato sódico (SDS), fosfato disódico 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), hidroxitolueno butilado (BHT), persulfato de potasio, sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), cloruro ferroso tetrahidratado, sal monosódica hidratada del ácido 3-(2-Piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-p,p'-disulfónico (FerroZine) y ácido etilendiaminotetraacético sal sódica dihidratada (EDTA) de Sigma-Aldrich, Co. (St Louis, MO, USA); tris(hidroximetil)aminometano, dimetilsulfóxido (DMSO), fosfato de sodio, ácido gálico, ácido ascórbico y ácido tricloroacético (TCA) de Scharlau Chemie, S.A. (Sentmenat, Barcelona, España); ferrocianuro de potasio y cloruro férrico de MP Biomedicals (Illkirch, France); y el reactivo de Folin-Ciocalteu de PanReac AppliChem (Castellar del Vallès, Barcelona, España). El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

3.2. Obtención del extracto rico en bromelina

Para la obtención del extracto acuoso rico en bromelina se utilizó la corona de la piña. Para ello, se cortó la corona en trozos de dimensión pequeña y se mezclaron en proporción 1:1 (g/mL) con agua fría. La mezcla se homogenizó en un Stomacher (BagMixer 400, Interscience, France) durante 10 min separados por un periodo de enfriamiento de 5 min para evitar el sobrecalentamiento de la mezcla y mantener la estabilidad de la enzima. Una vez finalizada la homogenización, se tomó la fracción líquida de la mezcla y se centrifugó a 8000 g, 4 °C durante 20 min. Finalmente, se recogió el sobrenadante, lo que sería el extracto acuoso, y se midió su actividad enzimática la cual fue de 9.8 U/mL.

3.3. Obtención de las harinas hidrolizadas de frijol negro

Para la obtención de las harinas hidrolizadas de frijol negro, se mezcló la harina de frijol negro con el extracto acuoso de la corona de piña o la disolución de bromelina comercial con la misma actividad enzimática en una proporción 1:3 (g:mL). Posteriormente, se incubaron las muestras durante 2, 4 y 6 h a 37 °C con agitación. Paralelamente, se realizó el mismo proceso con agua para la obtención de las harinas control. Tras el periodo de incubación, se inactivó la enzima en un baño a 95°C durante 1 h. Finalmente, las harinas se liofilizaron y molieron.

3.4. Determinación del grado de hidrólisis proteica de las harinas hidrolizadas de frijol negro

El grado de hidrólisis proteica (GH) es la proporción de enlaces peptídicos que se han hidrolizado, es decir, los enlaces peptídicos que se han roto durante la hidrólisis (Rutherford, 2010). Por una parte, se determinaron el número total de enlaces peptídicos y, por otra, el número de enlaces peptídicos hidrolizados.

Para dicho fin, se determinaron los grupos aminos libres en ambos casos y, a continuación, procedió al cálculo del GH expresado en porcentaje mediante la Ecuación 1.

$$GH (\%) = \frac{h-h_0}{h_{tot}-h_0} \times 100 \quad (1)$$

Donde h , h_0 y h_{tot} representan la concentración de grupos amino libres en los hidrolizados, antes de la hidrólisis y tras la hidrólisis completa de la muestra, respectivamente.

3.4.1. Determinación del número total de enlaces peptídicos

Se realizó una hidrólisis total con ácido para la determinación del número total de enlaces peptídicos. Para ello, se mezclaron 0,1 g de harina de frijol negro con 2,5 mL de HCl 6 M y se incubó a 100 °C durante 24 horas. Transcurrido dicho tiempo, se sacaron de la estufa y se enfriaron. Posteriormente, se centrifugó a 10000 g , 20 °C durante 10 min y se recuperó el sobrenadante al que se le determinaron los grupos aminos libres empleando el método del TNBS.

3.4.2. Determinación de enlaces peptídicos hidrolizados

Para determinar el número de enlaces peptídicos hidrolizados se prepararon suspensiones de harina de frijol negro en agua bidestilada al 1% (p/p). Dichas suspensiones se agitaron durante 5 h en un agitador Intell-Mixer™ RM-2 (ELMI Ltd., Riga, Letonia). Posteriormente, las muestras se centrifugaron y se determinaron en los sobrenadantes los grupos amino libres mediante el método del TNBS.

3.4.3. Método del TNBS

Para determinar el contenido de grupos amino libres se utilizó el método del TNBS descrito por Adler-Nissen (1979). Para ello, se tomaron 40 μ L de muestra, y se añadieron 320 μ L de TNBS al 0,1 % (v/v) y 320 μ L de tampón fosfato de sodio 0,2 M con un pH de 8,2. A continuación, las muestras se agitaron y se incubaron durante 1 h a una

temperatura de 50 °C. Tras la incubación, se adicionaron 640 µL de HCl 0,1 N y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min. Transcurrido el tiempo, se realizó la lectura de la absorbancia a 340 nm con un espectrofotómetro (VANTAstar, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Los resultados se expresaron como mg de L-leucina/g muestra seca, los cuales fueron calculados a partir de una recta patrón de L-leucina (1-5 mM).

3.5. Determinación del contenido de antinutrientes en las harinas hidrolizadas de frijol negro

Para la determinación del contenido de antinutrientes en las harinas hidrolizadas de frijol negro, se evaluaron en concreto el contenido de los siguientes compuestos: ácido fítico, inhibidores de tripsina, compuestos fenólicos totales y taninos. En todos los casos, la extracción de las muestras se realizó por duplicado y la determinación por triplicado.

3.5.1. Ácido fítico

La determinación del contenido en ácido fítico (AF) se realizó según el método descrito por Embaby (2010) con algunas modificaciones. Para la extracción, en tubos de 15 mL se añadieron 2,5 mL de HCl (2,4%) a 0,1 g de harina, y se agitaron en un agitador Intelli-Mixer™ RM-2 (ELMI Ltd., Riga, Letonia) a 40 rpm durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifugaron las muestras a 6000 g durante 10 min a una temperatura de 4 °C. A continuación, se recuperó el sobrenadante y se tomó una alícuota de 0,75 mL a la que se le añadieron 0,25 mL de reactivo de Wade (0,03 % $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 0,3 % ácido sulfosalicílico en agua). Dicha mezcla se centrifugó a 7000 g durante 10 min y el sobrenadante se recogió para medir su absorbancia a 500 nm (VANTAstar, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Finalmente, los resultados fueron expresados en mg AF/g muestra.

3.5.2. Inhibidores de tripsina

El contenido en inhibidores de tripsina (IT) se determinó utilizando el método descrito por Ma *et al.* (2011) con algunas modificaciones. La extracción se realizó en tubos de 15 mL añadiendo 0,2 g de harina de frijol negro y 10 mL de NaOH 0,008 N. A continuación, se llevó a cabo una agitación durante 3 h y se controló que el pH de los extractos estuviera entre 8,4 y 10. Tras dicha agitación, se centrifugaron los tubos a 8000 g durante 10 min y, seguidamente, se recogió el sobrenadante. Para la determinación del contenido en IT se utilizó el BAPNA como sustrato. Para su preparación se disolvieron 40 mg de BAPNA en 1 mL de DMSO y se diluyó hasta 100 mL con tampón Tris 0,05 M, pH 8,2 precalentado a 37 °C. Paralelamente, se preparó la solución estándar de tripsina disolviendo 10 mg de tripsina en 0,5 L de HCl 1 mM. Posteriormente, para la determinación del contenido en IT se prepararon las diferentes muestras: un blanco (B) con 0,4 mL de agua bidestilada; un estándar (E) con 0,4 mL de disolución estándar de tripsina y 0,4 mL de agua bidestilada; un blanco de muestra (BM) con 0,2 mL de muestra y 0,2 mL de agua bidestilada; y la muestra (M) con 0,2 mL de muestra, 0,4 mL solución estándar de tripsina y 0,2 mL de agua bidestilada. A continuación, se precalentaron en un baño a 37 °C durante 10 min. Tras dicho tiempo de incubación, se les añadió 1 mL de sustrato BAPNA (calentado previamente a 37 °C)

y se volvieron a introducir en dicho baño durante otros 10 min. Por último, se añadieron a todas las muestras 0,2 mL de ácido acético al 30 % (v/v), y, adicionalmente, al blanco y al blanco de la muestra se les añadieron 0,4 mL de solución estándar de tripsina. Se centrifugaron los tubos a 8000 g durante 10 min, se tomaron los sobrenadantes y se procedió a la lectura de la absorbancia a 410 nm (VANTAstar, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Finalmente, los resultados se expresaron como mg IT/g muestra y se calcularon siguiendo la Ecuación 2.

$$mg\ IT/g\ muestra = \frac{[(A_E - A_B) - (A_M - A_{BM})] \times D \times V_E}{0,019 \times g \times 1000 \times V_M} \quad (2)$$

Siendo A_E , A_B , A_M , y A_{BM} la absorbancia del E, del B, de la M, y del BM, respectivamente; V_E y V_M el volumen de extracción y el de muestra utilizado en el ensayo, respectivamente; y D el factor de la dilución, y g los gramos de la muestra.

3.5.3. Compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos totales (CFT) fueron determinados siguiendo el método descrito por Teixeira-Guedes *et al.* (2019). Para la extracción de dichos compuestos, en tubos de 15 mL se añadieron 0,2 g de harina de frijol negro y 2 mL de metanol:agua (80:20, v/v). Posteriormente, los tubos se agitaron en oscuridad a 40 rpm durante 24 h. Tras dicha agitación, los tubos se centrifugaron a 8000 g durante 10 min. A continuación, se recogió el sobrenadante y se tomaron 20 μ L, a los cuales se añadieron 100 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu al 10 % (v/v) y 80 μ L de carbonato de sodio al 7,5%, todo ello en una microplaca de 96 pocillos. La mezcla se incubó a 42 °C durante 30 min y, transcurrido dicho tiempo, con un lector de microplacas (VANTAstar, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania), se leyó la absorbancia a 765 nm. Finalmente, los resultados se expresaron en mg ácido gálico/g muestra.

3.5.4. Taninos

Para la determinación de los taninos (TA) se utilizó el método estandarizado por la AOAC (Embaby, 2010). En tubos de 15 mL se realizó la extracción de los TA añadiendo 10 mL de acetona al 70 % a 0,2 g de harina de frijol negro. A continuación, dichos tubos se agitaron durante 24 h en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron durante 20 min a 3000 g y se recogió el sobrenadante. Posteriormente, se tomó una alícuota de 0,1 mL de sobrenadante a la que se le añadieron 0,1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, 1,6 mL de agua bidestilada y 0,2 mL de carbonato de sodio al 20 %, y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Tras la incubación, se efectuó la lectura de la absorbancia a 760 nm (VANTAstar, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Finalmente, los resultados se expresaron en mg ácido tánico/g muestra.

3.6. Determinación de la digestibilidad proteica de las harinas hidrolizadas de frijol negro

La digestibilidad proteica *in vitro* se determinó midiendo el GH durante la digestión gastrointestinal tal y como describe Purwandari *et al.* (2023). Para ello, se simuló la digestión gastrointestinal siguiendo el protocolo estandarizado INFOGEST (Brodkorb *et al.*, 2019; Minekus *et al.*, 2014) y se midieron los grupos amino libres con el método del TNBS descrito en el punto 3.4.3. Finalmente, se calculó el GH tal y como se muestra en

la Ecuación 1 pero en este caso h era la concentración de grupos amino libres tras la DGI y h_0 la concentración de grupos amino libres antes de la DGI.

3.6.1. Digestión gastrointestinal *in vitro*

La simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* (DGI) de las harinas de frijol negro se llevó a cabo por duplicado tal y como se especifica en el protocolo estandarizado INFOGEST (Brodkorb *et al.*, 2019; Minekus *et al.*, 2014).

En primer lugar, siguiendo el protocolo de Minekus *et al.* (2014), se prepararon los fluidos simulados: fluido salival simulado (FSS), fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS). A continuación, se llevó a cabo la DGI, y para ello, se utilizó un agitador Intelli-MixerTM RM-2 (ELMI Ltd., Riga, Letonia) y una cámara de incubación (Selecta, S.A., Barcelona, España) a 37 °C.

La simulación de la DGI, está compuesta por tres fases diferenciadas: la fase oral, la fase gástrica y la fase intestinal. En primer lugar, se simuló la fase oral, la cual consistió en mezclar 0,5 g de harina con 0,5 g de agua y diluir la mezcla en una proporción 1:1 (p/v) con FSS y α -amilasa (75 U/mL). A continuación, dicha mezcla se incubó durante 2 min. Transcurrido estos, se disminuyó el pH hasta un valor de 3 con HCl 2 M. Para iniciar la simulación de la fase gástrica, se añadió al bolo oral FGS y pepsina gástrica (2000 U/mL) en una proporción 1:1 (v/v) y se incubó durante 120 min. A continuación, se aumentó con NaOH 1 M el pH de la mezcla hasta alcanzar un valor de 7. Finalmente, para la simulación de la fase intestinal, el quimo gástrico obtenido en la etapa anterior se mezcló en proporción 1:1 (v/v) con FIS, pancreatina (100 U/mL basadas en la actividad de la tripsina) y extracto biliar bovino (10 mM), y se incubó otros 120 min. Transcurrido el tiempo, para parar la digestión, se inactivaron las enzimas mediante choque térmico que consistió en introducir las muestras en un baño de agua a 95 °C durante 5 min, seguido de un baño con hielo durante 10 min. Por último, las muestras se centrifugaron a 8000 g, 4 °C durante 10 min, se separaron los sobrenadantes y se determinaron los grupos amino libres. Además de las muestras, se digirió un blanco al que se le habían sustituido los 0,5 g de harina por agua.

3.7. Determinación de la bioaccesibilidad del hierro de las harinas hidrolizadas de frijol negro

La bioaccesibilidad se define como la fracción de un compuesto que se libera de su matriz alimentaria en el tracto gastrointestinal y queda así disponible para su absorción (Cilla *et al.*, 2018; Mattar *et al.*, 2022). Por ello, para la determinación de la bioaccesibilidad del hierro de las harinas de frijol negro, se simuló la DGI, tal y como se describe en el punto 3.6.1., y se determinó el contenido de hierro total por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) (Agilent Technologies, Inc. Headquarters, Santa Clara, California, US) en el sobrenadante de la digestión y en las muestras antes de la digestión. Los resultados se expresaron en porcentaje y es la proporción de hierro total disponible para ser absorbido frente al total de la muestra.

3.8. Determinación de la actividad antioxidante de las harinas hidrolizadas de frijol negro

Para la determinación de la actividad antioxidante de las harinas hidrolizadas de frijol negro, se utilizaron tres métodos: el método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), el método de captación del radical ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y el método del poder reductor del hierro, conocido como FRAP por sus siglas en inglés de "Ferric-reducing antioxidant power". Para la determinación se realizó una extracción con agua. Para ello, se prepararon dispersiones de harina en agua al 1 % (p/p), se agitaron durante 5 h, se centrifugaron y se recogió el sobrenadante. Cada uno de los duplicados se analizó por triplicado.

3.8.1. Método DPPH

Para la determinación de la actividad antioxidante de las muestras mediante el método del DPPH, se siguió el protocolo descrito por Bersuder *et al.* (1998). Para ello, se añadió por cada 80 µL de muestra, 400 µL de etanol y 100 µL de solución DPPH (0,02 % en etanol). Seguidamente, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 60 min. De esta forma, los radicales reducidos se midieron posteriormente en un espectrofotómetro a 517 nm. En dicho análisis, se utilizó como control negativo agua bidestilada y como control positivo BHT a una concentración de 2 mg/mL. Finalmente, los resultados se expresaron en porcentaje de actividad antioxidante, calculándose respecto a los valores de absorbancia del control negativo tal y como se muestra en la Ecuación 3.

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = \frac{Ac - As}{Ac} \times 100 \quad (3)$$

Siendo A_s la absorbancia de la muestra a 517 nm y A_c la absorbancia del control negativo a 517 nm.

3.8.2. Método ABTS

Las muestras fueron analizadas utilizando el método ABTS descrito por Re *et al.* (1999) con pequeñas modificaciones. Se empezó disolviendo el ABTS (7 mM) en persulfato potásico (2,45 mM) y dejándolo durante 12 h en oscuridad para producir los radicales ABTS^{•+}. Tras dicho tiempo, se mezcló la solución de ABTS con tampón fosfato salino (PBS, 50 mM, pH 7,4) en la proporción adecuada para obtener a 734 nm una absorbancia de $0,70 \pm 0,02$. A continuación, se añadieron 990 µL de la solución de ABTS obtenida con anterioridad a 10 µL de muestra y se agitó. Por último, se incubó a temperatura ambiente durante 6 min y se realizó la lectura de la absorbancia a 734 nm. Para dicho método, se empleó como control negativo PBS y como control positivo ácido ascórbico (4 mM). Finalmente, los resultados se expresaron en porcentaje de actividad antioxidante, calculándose respecto a los valores de absorbancia del control negativo siguiéndose igualmente la Ecuación 3 pero, en este caso, las absorbancias hacen referencia a una longitud de onda de 734 nm.

3.8.3. Método FRAP

Se llevó a cabo el método FRAP descrito por Huang *et al.* (2006). De esta forma, se tomaron 100 µL de muestra a la que se le adicionaron 100 µL de ferrocianuro de potasio a una concentración de 10 mg/mL y 100 µL del tampón fosfato de sodio (200 mM) con

un pH de 6,6. A continuación, se incubó la mezcla durante 20 min a 50 °C en oscuridad. Terminada la incubación, se adicionaron 100 µL de TCA en una concentración de 100 mg/mL. Posteriormente, se centrifugó la disolución durante 10 min a 2000 g. Tras la centrifugación, se recogió el sobrenadante y se tomaron 250 µL de éste. Seguidamente, se le añadió 50 µL de cloruro férrico 1 mg/mL y 250 µL de agua bidestilada. Por último, se llevó a cabo la lectura de la absorbancia a 700 nm. En este caso, se empleó agua bidestilada como control negativo y BHT (2 mg/mL) como control positivo. En cuanto a los resultados, éstos se expresaron en referencia a los valores de absorbancia a 695 nm.

3.9. Determinación de la actividad quelante del hierro de las harinas hidrolizadas de frijol negro

Para la medida de la actividad quelante de hierro se llevó a cabo el método descrito por Taheri *et al.* (2014) con pequeñas modificaciones. Se utilizaron los mismos extractos que los utilizados en la actividad antioxidante y cada duplicado se analizó por triplicado. De esta forma, en primer lugar, se añadieron 50 µL de muestra a una microplaca de 96 pocillos. A continuación, se adicionaron 25 µL de cloruro ferroso 2 mM y 100 µL de agua bidestilada y se incubó en oscuridad durante 3 min. Transcurrida dicha incubación, se adicionaron 100 µL de FerroZine 5 mM y se incubó de nuevo durante 10 min en oscuridad. Finalmente, se realizó la lectura de la absorbancia a 562 nm en el lector de placas VANTASTAR (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Se utilizó como control negativo agua bidestilada y como control positivo EDTA 0,1 mg/mL. Finalmente, los resultados se expresaron como el porcentaje de quelación, el cual se calculó a partir de la ecuación 4:

$$\text{Actividad quelante (\%)} = \left(1 - \frac{A_s}{A_c}\right) \times 100 \quad (4)$$

Siendo A_s la absorbancia de la muestra a 562 nm y A_c la absorbancia del control negativo a 562 nm.

3.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis simple de la varianza (ANOVA) utilizando el programa Statgraphics Centurion XVIII (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA, EE.UU.). El método empleado para discernir entre las medias fue la prueba de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey con un nivel de confianza del 95 %.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Grado de hidrólisis de las harinas hidrolizadas de frijol negro

El GH de las harinas hidrolizadas hace referencia a la proporción de enlaces peptídicos que se han roto durante hidrólisis. Para determinarlos se midieron los grupos amino libres tras la hidrólisis y la hidrólisis completa de las muestras y se expresó en porcentaje tal y como se muestra en la Figura 1.

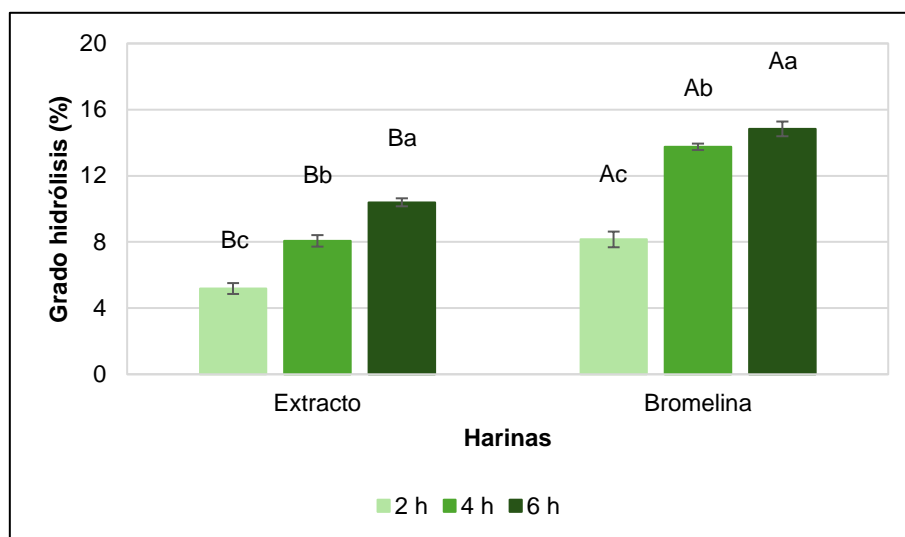


Figura 1. Grado de hidrólisis de las harinas de frijol negro hidrolizadas con extracto de la corona de la piña y con bromelina comercial.

2 h, 4 h, 6 h: tiempo de incubación en horas.

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre diferentes tipos de muestra (agua, extracto, y bromelina) dentro de un mismo tiempo de incubación ($p < 0.05$). Diferentes letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de incubación (2 h, 4 h, y 6 h) dentro de un mismo tipo de muestra ($p < 0.05$).

En la Figura 1 se puede observar cómo los valores del GH de las harinas oscilaron entre el 5,2 y el 14,8 %. Concretamente, los valores de las muestras hidrolizadas con extracto oscilaron entre el 5,2 y el 10,4 %, mientras que los de las hidrolizadas con bromelina comercial fueron significativamente ($p < 0,05$) superiores y oscilaron entre el 8,2 y el 14,8 %. El aumento observado podría estar relacionado con las condiciones de hidrólisis. La bromelina tiene un rango de acción óptimo de pH de 5 a 8, en el que la actividad enzimática es máxima (Clavijo *et al.*, 2012). En este caso, el extracto de la corona tenía un pH de 4,4, ligeramente inferior a la disolución de la bromelina comercial que estaba entorno al 5,5. Con lo cual, esa distancia frente al rango de pH óptimo podría estar provocando las diferencias que se observan. Otra de las razones, podría ser la presencia de impurezas en el extracto. A pesar de tener la misma actividad enzimática el extracto y la disolución de bromelina, la presencia de impurezas podría haber afectado negativamente a la actividad enzimática y por ende al grado de hidrólisis (Gautam *et al.*, 2010). No obstante, aunque utilizando el extracto se haya alcanzado un grado de hidrólisis proteica inferior en comparación con la bromelina comercial, éste es significativo, con lo cual, puede ser una alternativa a tener en cuenta ya que es más

sostenible y económica (Tacias-Pascacio *et al.*, 2023). Asimismo, también hay un efecto significativo del tiempo ya que el grado de hidrólisis aumentó conforme aumentaba el tiempo de incubación. Esto se fundamentaría en el hecho de que, al aumentar el tiempo de incubación, aumenta el tiempo de actuación de la enzima y, por tanto, ésta sería capaz de hidrolizar una mayor cantidad de sustrato hasta alcanzar el grado de hidrólisis máximo. La misma tendencia obtuvieron Zheng *et al.* (2020) al hidrolizar un aislado proteico de soja verde con bromelina y ficina, donde observaron un aumento del GH hasta alcanzar los 300 min donde se comenzaron a ver valores constantes.

4.2. Contenido de antinutrientes en las harinas hidrolizadas de frijol negro

El grado de hidrólisis proteica de las harinas puede afectar al contenido en antinutrientes de las harinas hidrolizadas ya que algunos de ellos son de naturaleza proteica y otros interaccionan y forman complejos con ellas. Por ello, se determinó el contenido en ácido fítico (AF), inhibidores de tripsina (IT), compuestos fenólicos totales (CFT) y taninos (TA). Los resultados a los diferentes tiempos de incubación se muestran en la Figura 2.

En la Figura 2A se muestran los valores correspondientes al contenido de AF de las muestras. Éstos oscilaron entre 20,7 y 24,5 mg AF/g. En concreto, los valores de AF de las harinas control estuvieron entre 22,7 y 24,5 mg AF/g, en las harinas hidrolizadas con bromelina comercial entre 22,8 y 23,5 mg AF/g, y en las harinas hidrolizadas con extracto entre 20,7 y 22,3 mg AF/g. Analizando las diferencias entre los diferentes tipos de muestras, en general, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las muestras control y las muestras hidrolizadas, excepto en el caso de las muestras hidrolizadas con extracto durante 2 y 6 h que tuvieron un contenido significativamente inferior. En cuanto al efecto del tiempo de incubación, no se observaron diferencias significativas entre las muestras incubadas a los distintos tiempos en el caso de las muestras control y las hidrolizadas con bromelina comercial, mientras que en las muestras hidrolizadas con extracto sí que se observaron diferencias entre las 4 h y las 6 h de incubación, mostrando un menor contenido de AF al aumentar el tiempo de incubación. La ausencia de diferencias significativas entre la mayoría de las muestras y entre los diferentes tiempos podrían ser debidas a que la enzima no esté hidrolizando las proteínas que se encuentran acomplejadas con el AF, lo que supondría que éste no se liberara y por lo tanto no cambiara su contenido respecto al contenido inicial. Lo contrario sucedió en el estudio de Ribéreau *et al.* (2018) en harinas de guisantes hidrolizadas con papaína y bromelina, donde se observó que el contenido en AF aumentó en las harinas hidrolizadas con respecto a las harinas control, debido a la liberación del AF que estaría acomplejado con proteínas.

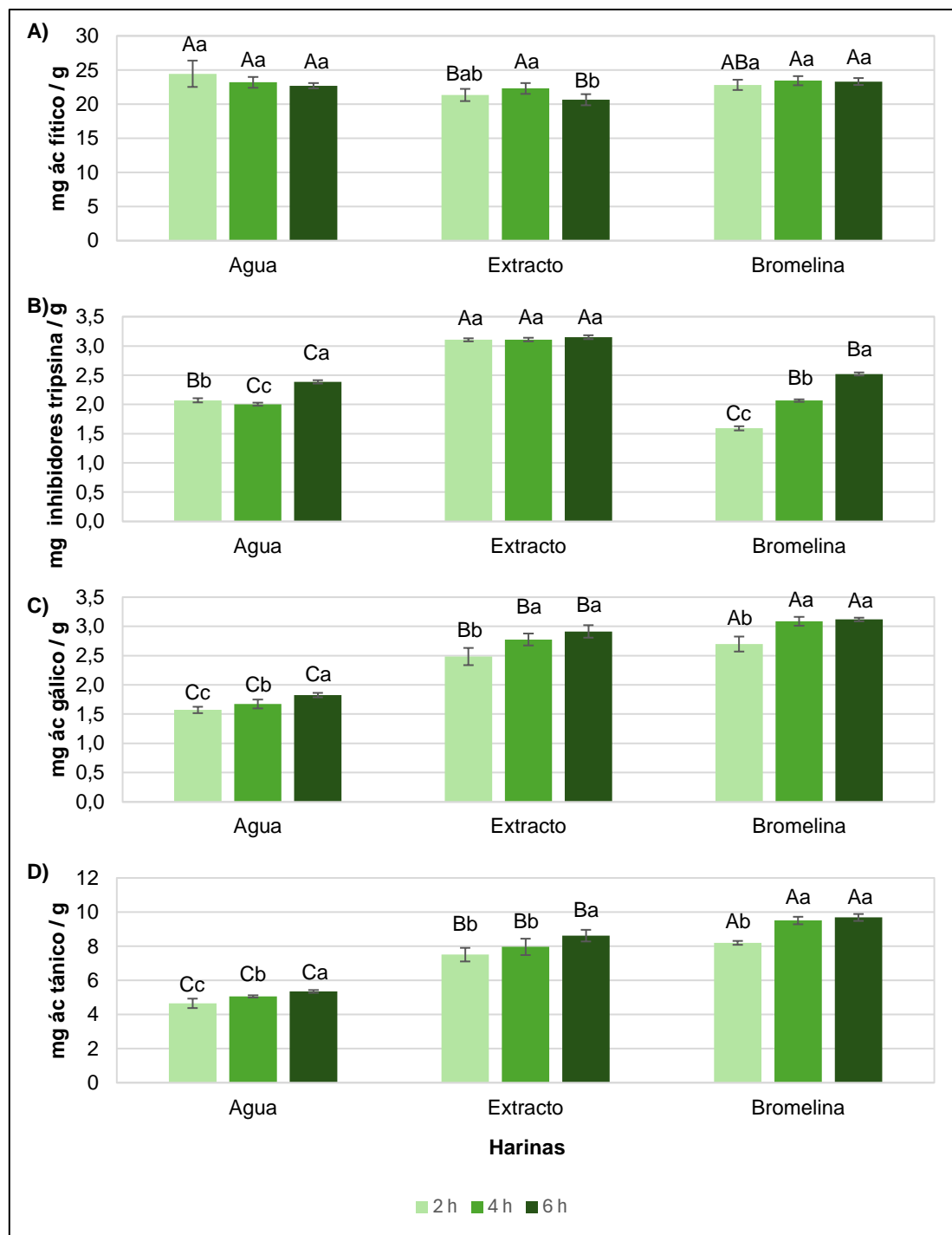


Figura 2. Contenido de antinutrientes de las harinas de frijol negro control (agua) e hidrolizadas con extracto de la corona de la piña y con bromelina comercial. Contenido de A) ácido fítico, B) inhibidores de tripsina, C) compuestos fenólicos totales, y D) taninos.

2 h, 4 h, 6 h: tiempo de incubación en horas

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre diferentes tipos de muestra (agua, extracto y bromelina) dentro de un mismo tiempo de incubación ($p < 0.05$). Diferentes letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de incubación (2 h, 4 h y 6 h) dentro de un mismo tipo de muestra ($p < 0.05$).

En la Figura 2B se observa que los valores de IT oscilaron entre 1,6 y 3,2 mg IT/g. Concretamente, los valores de las harinas hidrolizadas con extracto fueron significativamente superiores (3,1- 3,2 mg IT/g), que los de las harinas control (2,0-2,4 mg IT/g) y las harinas hidrolizadas con bromelina (1,6-2,5 mg IT/g). Esta tendencia se puede deber a que el extracto acuoso de la piña esté aportando IT de manera adicional que provienen de la piña. Emmanuel y Deborah (2018) reportaron que la piña contenía un nivel de IT igual a 1.06 TIU/mg. Por otra parte, entre las muestras control y las muestras hidrolizadas con bromelina se observaron diferencias significativas. Tras 2 h de incubación el contenido en IT disminuyó, mientras que tras 4 y 6 h aumentó, aunque dichas diferencias no fueron muy grandes. Esta falta de una tendencia clara coincide con los resultados de Klahan *et al.* (2021), quienes no observaron una alteración en el contenido de IT en pienso para gambas con un 38% de proteína bruta, destinada a la alimentación para camarón blanco del Pacífico, tras el empleo de extracto crudo de bromelina de piña. Por el contrario, Goertzen *et al.* (2021) observaron en aislados de proteína de garbanzos hidrolizados con diferentes proteasas una disminución de la actividad de los IT respecto a los aislados control, y la asociaron a que al hidrolizar la proteína, los IT serían más susceptibles a la desnaturalización, tanto por altas temperaturas como por la propia acción de las proteasas, disminuyendo así su contenido (Goertzen *et al.*, 2021). Al analizar el efecto del tiempo de incubación en el contenido de IT, se muestra que en el caso de las harinas hidrolizadas con extracto no se observaron diferencias significativas entre los distintos tiempos de incubación. Sin embargo, en las muestras control y en las hidrolizadas con bromelina sí se observaron diferencias significativas, siendo los valores más altos los correspondientes al tiempo de incubación de 6 h. Además, cabe destacar, que en la muestra hidrolizada con bromelina el aumento es progresivo conforme transcurre el tiempo de incubación, lo que podría estar relacionado con el grado de hidrólisis, ya que al romper la proteína estos podrían haber quedado más expuestos.

En la Figura 2C se presenta el contenido en CFT de las harinas control e hidrolizadas, expresado como mg ácido gálico/g, los cuales oscilaron entre 1,6 y 3,1 mg/g. En concreto, las harinas control contenían entre 1,6 y 1,8 mg/g, las harinas hidrolizadas con extracto entre 2,5 y 2,9 mg/g, y las harinas hidrolizadas con bromelina entre 2,7 y 3,1 mg /g. Al analizar las diferencias significativas entre los diferentes tipos de muestras, se observó que, para todos los tiempos de incubación, las harinas control tenían un contenido en CFT significativamente inferior al de las harinas hidrolizadas. Asimismo, las muestras que tenían un mayor contenido en CFT fueron las hidrolizadas con bromelina comercial, lo que podría relacionarse con su mayor grado de hidrólisis. Que las muestras hidrolizadas presenten un mayor contenido de CFT podría deberse a que dicha hidrólisis produciría la ruptura de los enlaces covalentes formados por los compuestos fenólicos y las proteínas, quedando libres pero retenidos en la harina y, por tanto, siendo detectables (Ribéreau *et al.*, 2018). Por otra parte, al analizar el efecto del tiempo, existe un aumento significativo del contenido en CFT a medida que aumenta el tiempo de incubación. De esta forma, en las harinas hidrolizadas con extracto y bromelina comercial, el aumento del contenido en CFT podría estar relacionado con el mayor grado de hidrólisis, tal como se ha comentado anteriormente. Además, en estos casos, solo hay diferencias significativas entre las 2 h y las 4 h de incubación, siendo no significativo el aumento entre 4 h y 6 h. Esto podría deberse a que, aunque el grado de hidrólisis sigue aumentando entre las 4 y las 6 h de hidrólisis, el aumento es inferior al

observado entre las 2 y 4 h de incubación, con lo cual, aunque hay hidrólisis podría no estar afectando a los complejos formados entre las proteínas y los compuestos fenólicos. En cuanto a las muestras control, también se observa un aumento respecto al tiempo, lo que podría deberse a que durante la incubación parte de los CFT se hayan solubilizado en el agua, por lo que se extraerían más fácilmente y serían más detectables.

Por último, el contenido en TA de las distintas harinas control e hidrolizadas expresado como mg de ácido tánico/ g muestra se muestra en la Figura 2D. Las harinas control contenían entre 4,6 y 5,4 mg/g, las harinas hidrolizadas con extracto contenían entre 7,5 y 8,6 mg/ g, mientras que las harinas hidrolizadas con bromelina contenían entre 8,2 y 9,7 mg/ g. Como se puede observar, los resultados tenían la misma tendencia que los CFT, pues se observaron diferencias significativas entre los diferentes tipos de muestra siendo mayor el contenido de las harinas hidrolizadas con bromelina, seguidas de las muestras hidrolizadas con extracto y, finalmente, las harinas control. Esta relación se explica debido a que los TA son un tipo de compuestos fenólicos (Singh *et al.*, 2017). Es por ello por lo que, tal y como se ha discutido anteriormente en el caso de los CFT, el aumento del contenido en TA estaría también estrechamente relacionado con el aumento del grado de hidrólisis de las harinas, debido en esta ocasión a que al hidrolizarse las proteínas que formaban complejos con los TA, estos se liberarían. Asimismo, en cuanto al efecto del tiempo de incubación, se muestra de manera general que, a mayor tiempo de incubación, mayor contenido en TA. En las harinas hidrolizadas con extracto, se observaron diferencias significativas entre las 4 y las 6 h de incubación, mientras que para las harinas hidrolizadas con bromelina se observaron entre las 2 y las 4 h de incubación. Dicha tendencia encaja con la observada en el grado de hidrólisis ya que la hidrólisis de la bromelina comercial es más pronunciada entre las 2 y las 4 h de incubación mientras que la hidrólisis con el extracto es más progresiva y proporcional durante las 6 h de incubación. Ese ligero aumento observado con el tiempo de incubación en las harinas control podría ser debido a esa pequeña solubilización que podría haberse producido durante la incubación, tal y como se ha comentado en los CFT.

4.3. Digestibilidad proteica de las harinas hidrolizadas de frijol negro

La digestibilidad proteica de las harinas se evaluó midiendo el grado de hidrólisis de las proteínas durante la digestión gastrointestinal *in vitro* y se expresó en porcentaje tal y como se muestra en la Figura 3. La digestibilidad proteica de las distintas harinas osciló entre el 61,2 y 73,3 %. Concretamente, las muestras control tenían valores entre el 65,6 y 69,8 %, las harinas hidrolizadas con extracto entre 61,2 y 67,9 % y las harinas hidrolizadas con bromelina comercial entre el 68,8 y 73,3 %. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las harinas control y las hidrolizadas con bromelina. Sin embargo, éstas últimas sí que resultaron tener un porcentaje de digestibilidad proteica significativamente superior a la de las muestras hidrolizadas con extracto. La ausencia de un aumento significativo en la digestibilidad proteica entre las muestras control y las muestras hidrolizadas con bromelina coincide con los resultados obtenidos por Goertzen *et al.* (2021), en el que no observaron diferencias estadísticamente significativas entre el aislado de proteína de garbanzos control y los

hidrolizados con pepsina, tripsina o papaína. Finalmente, que las muestras hidrolizadas con extracto presentaran de manera general una digestibilidad proteica inferior a las muestras hidrolizadas con bromelina, podría deberse al mayor contenido de antinutrientes, especialmente de IT, que interaccionarían con las enzimas digestivas impidiendo su acción sobre las proteínas (Ohanenye *et al.*, 2020).

En cuanto al efecto del tiempo de incubación, en general, no fue significativo, excepto en las harinas hidrolizadas con extracto durante 2 y 4 h donde sí se observó un aumento significativo. Que no se observe una tendencia clara del efecto del tiempo podría deberse a que, aunque durante el tratamiento de hidrólisis se observó un mayor grado de hidrólisis proteica a medida que aumentó el tiempo de incubación (Raju, 2019; Chen *et al.*, 2011), también se observó un mayor contenido de algunos antinutrientes que podrían interaccionar con las proteínas durante la digestión y con lo cual, camuflar el efecto conseguido con la hidrólisis previa (Ohanenye *et al.*, 2020).

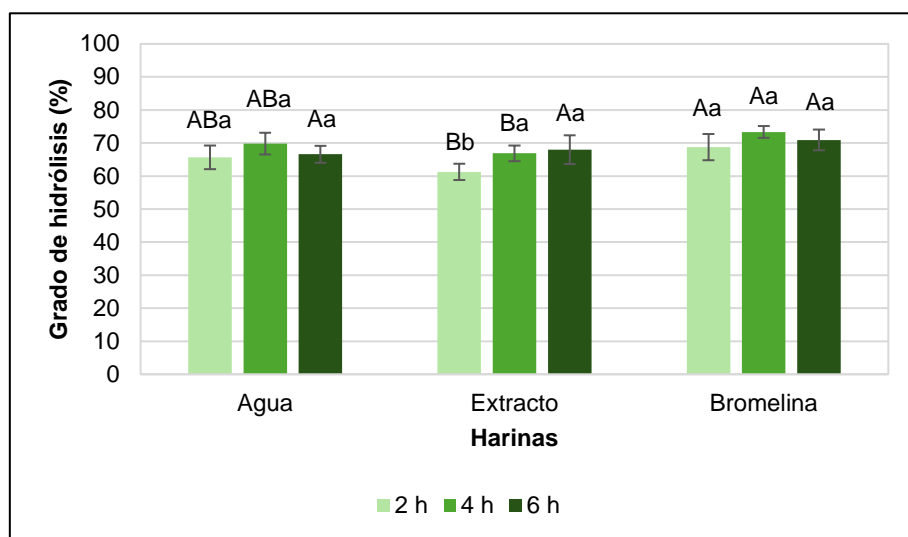


Figura 3. Grado de hidrólisis proteica de las harinas de frijol negro control (agua) e hidrolizadas con extracto de la corona de la piña y con bromelina comercial tras la digestión gastrointestinal *in vitro*.

2 h, 4 h, 6 h: tiempo de incubación en horas.

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre diferentes tipos de muestra (agua, extracto y bromelina) dentro de un mismo tiempo de incubación ($p < 0.05$). Diferentes letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de incubación (2 h, 4 h y 6 h) dentro de un mismo tipo de muestra ($p < 0.05$).

4.4. Bioaccesibilidad del hierro de las harinas hidrolizadas de frijol negro

La bioaccesibilidad del hierro hace referencia a la fracción de hierro total que se libera de la matriz alimentaria durante la DGI y queda disponible para ser absorbido. Los resultados se expresaron en porcentaje y se muestran en la Figura 4. En general, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tipos de muestra ni entre los distintos tiempos de incubación. Es decir, parece que el grado de hidrólisis no afectó a la bioaccesibilidad del hierro. Los valores obtenidos fueron muy bajos, oscilando entre el 4,8 y el 11,3 %, lo que podría deberse a su contenido en CFT

y TA, ya que estos compuestos pueden inhibir la absorción del hierro (Shubham *et al.*, 2020; Rousseau *et al.*, 2020). Al igual que en el caso de la digestibilidad proteica, es posible que la ausencia de una tendencia clara se deba a que el efecto de la hidrólisis proteica (Zhang *et al.*, 2023) se contrarreste con el aumento del contenido en antinutrientes (Shubham *et al.*, 2020; Rousseau *et al.*, 2020). Además, que no se observe un aumento, significará que no se han formado péptidos con actividad quelante del hierro durante la DGI, ya que estos se unen al hierro y facilitan su absorción (Guo *et al.*, 2014).

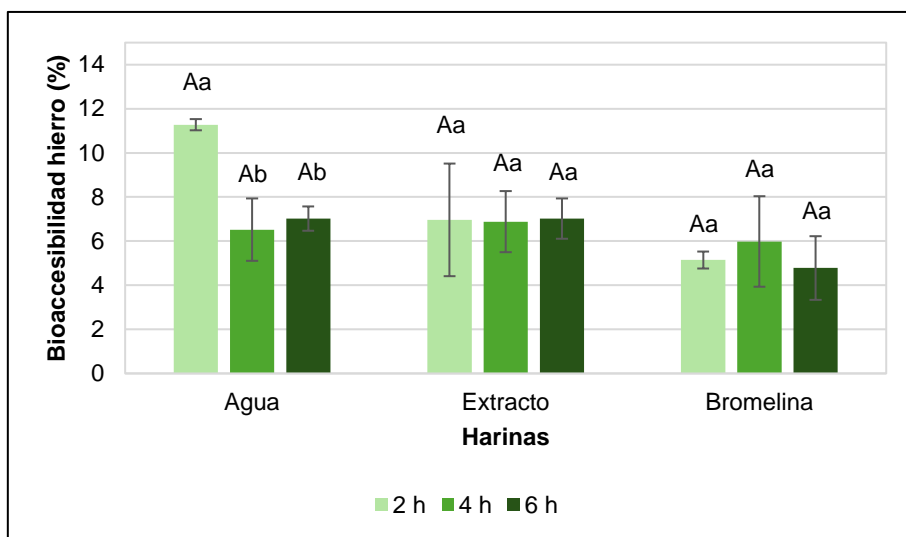


Figura 4. Bioaccesibilidad del hierro de las harinas de frijol negro control (agua) e hidrolizadas con extracto de la corona de la piña y con bromelina comercial.

2 h, 4 h, 6 h: tiempo de incubación en horas.

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre diferentes tipos de muestra (agua, extracto y bromelina) dentro de un mismo tiempo de incubación ($p < 0.05$). Diferentes letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de incubación (2 h, 4 h y 6 h) dentro de un mismo tipo de muestra ($p < 0.05$).

4.5. Actividad antioxidante de las harinas hidrolizadas de frijol negro

La actividad antioxidante se midió a través de tres métodos diferentes (método DPPH, método ABTS y método FRAP) debido a que los antioxidantes actúan bajo distintos mecanismos (transferencia de electrones o de átomos de hidrógeno). Por tanto, los diferentes resultados aportan información complementaria sobre la actividad antioxidante de la muestra (Munteanu y Apetrei, 2021). En la Figura 5 se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los métodos.

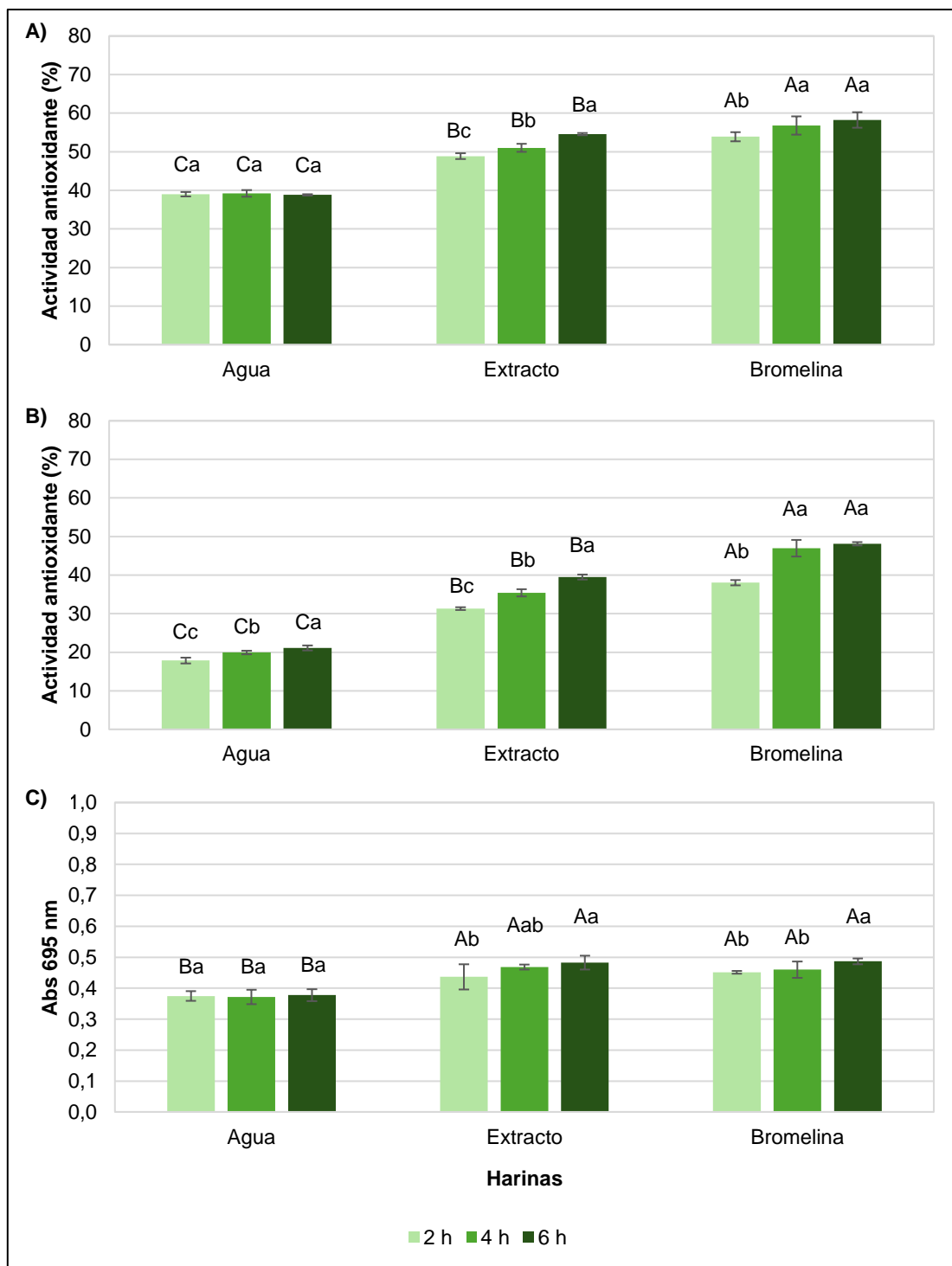


Figura 5. Actividad antioxidante de las harinas de frijol negro control (agua) e hidrolizadas con extracto de la corona de la piña y con bromelina comercial determinada con el método DPPH (A), con el método ABTS (B) y con el método FRAP (C).

2 h, 4 h, 6 h: tiempo de incubación en horas.

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre diferentes tipos de muestra (agua, extracto y bromelina) dentro de un mismo tiempo de incubación ($p < 0.05$). Diferentes letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de incubación (2 h, 4 h y 6 h) dentro de un mismo tipo de muestra ($p < 0.05$).

En primer lugar, la Figura 5A muestra los resultados obtenidos a través del método DPPH. Para los tres tiempos de incubación, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tres tipos de muestra, observándose una mayor actividad antioxidante en las harinas hidrolizadas con bromelina (54-58 %), seguidas de las harinas hidrolizadas con extracto (49-55 %) y, por último, y con una menor actividad antioxidante, las harinas control (39 %). En cuanto al efecto del tiempo de incubación, se observó que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres tiempos de incubación en las harinas control. Sin embargo, en las harinas hidrolizadas sí que se observó un aumento significativo de la actividad antioxidante como consecuencia del aumento del tiempo de incubación, lo que podría relacionarse con el grado de hidrólisis. En el caso de la harina hidrolizada con extracto, el aumento fue progresivo y las diferencias fueron significativas en los tres tiempos de incubación. Sin embargo, en el caso de las harinas hidrolizadas con bromelina el aumento fue significativo entre las 2 y las 4 h de incubación, pero no entre las 4 y las 6 h, lo que también podría relacionarse con el grado de hidrólisis, ya que entre las 2 y 4 h de incubación se observó un mayor aumento que entre las 4 y las 6 h.

En la Figura 5B se muestran los resultados obtenidos a través del método ABTS. Se observa que la tendencia de los resultados de las harinas hidrolizadas es idéntica a los obtenidos con el método DPPH con unos valores de actividad antioxidante entre el 18 y el 48 %.

Por último, en la Figura 5C se muestran los resultados obtenidos a través del método FRAP. En este caso, para un mismo tiempo de incubación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras hidrolizadas con extracto e hidrolizadas con bromelina, pero sí con la muestra control. En cuanto al efecto del tiempo de incubación, se observó la misma tendencia que en los otros métodos, pues en las muestras control no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres tiempos, mientras que en las muestras hidrolizadas sí que se observó un aumento significativo a medida que aumentó el tiempo de incubación.

El aumento de la actividad antioxidante observado en las muestras hidrolizadas, así como el aumento progresivo a medida que aumentó el tiempo de incubación, podría estar relacionado con el grado de hidrólisis y con los compuestos fenólicos, ya que se ha visto que también aumentaban a medida que aumentaba el tiempo de incubación como consecuencia de la hidrólisis (Jamdar *et al.*, 2017). Xu *et al.* (2021) hidrolizaron aislados de proteínas extraídos de gandul, lentejas y garbanzos con la enzima alcalasa y bromelina, así como do Evangelho *et al.* (2016) quienes hidrolizaron un concentrado proteico de frijol negro con la enzima alcalasa y pepsina, y Zheng *et al.* (2019) hidrolizaron proteína de frijol negro empleando ficina, bromelina y alcalasa, y todos ellos observaron un aumento de la actividad antioxidante de los hidrolizados frente al control.

Asimismo, el aumento de la actividad antioxidante con el grado de hidrólisis también se asocia a la generación de péptidos bioactivos (Ketnawa y Ogawa, 2019). Sin embargo, en estos estudios (Xu *et al.*, 2021) (Zheng *et al.*, 2019) se alcanzaron grados de hidrólisis relativamente superiores a los grados de hidrólisis obtenidos en el estudio, con lo cual, sería menos probable, ya que los péptidos con dicha bioactividad suelen ser de pequeño tamaño (Ketnawa y Ogawa, 2019).

4.6. Actividad quelante del hierro de las harinas hidrolizadas de frijol negro

La actividad quelante es el proceso en el cual un agente quelante forma complejos con los iones metálicos. De esta forma, los agentes quelantes son aquellos compuestos, orgánicos e inorgánicos, que muestran dicha capacidad de quelar (Flora y Pachauri, 2010). En la Figura 6 se muestra la actividad quelante de hierro, expresada en porcentaje, de las distintas harinas control e hidrolizadas, mostrando en general valores de por sí relativamente altos debido probablemente a la presencia de antinutrientes que tienen actividad quelante, como son el AF (R. Khattab *et al.*, 2010; Ologhobo y Fetuga, 1983) y los TA (Andrews *et al.*, 2014). De esta forma, en relación con el contenido del AF, mostrado en la Figura 2A, éste tiene una tendencia similar a la mostrada en la Figura 6. Como se puede observar en ésta, los valores de la actividad quelante oscilaron entre 52,4 y 64,9 % no observándose diferencias estadísticamente significativas entre las muestras control y las muestras hidrolizadas con bromelina. Sin embargo, éstas mostraron una actividad quelante significativamente superior a la de las muestras hidrolizadas con extracto. En cuanto al efecto del tiempo, en las muestras hidrolizadas con bromelina, no se observaron diferencias significativas entre los tres tiempos de incubación. Por otro lado, en cuanto a las muestras control y las muestras hidrolizadas con extracto, en rasgos generales tampoco se observaron diferencias significativas, observándose pequeñas diferencias exclusivamente entre las 4 h y a 6 h de incubación en el primer caso, y entre las 2 h y 4-6 h en el segundo caso.

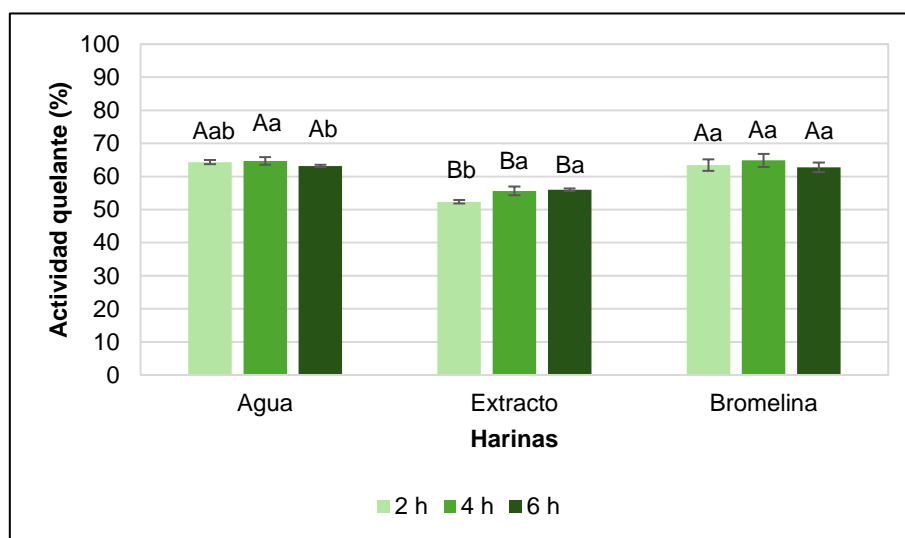


Figura 6. Actividad quelante del hierro de las harinas de frijol negro control (agua) e hidrolizadas con extracto de la corona de la piña y con bromelina comercial.

2 h, 4 h, 6 h: tiempo de incubación en horas.

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre diferentes tipos de muestra (agua, extracto y bromelina) dentro de un mismo tiempo de incubación ($p < 0.05$). Diferentes letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de incubación (2 h, 4 h y 6 h) dentro de un mismo tipo de muestra ($p < 0.05$).

Se ha reportado que la hidrólisis de las proteínas puede generar péptidos bioactivos con actividad quelante del hierro, mejorando así su biodisponibilidad ya que el hierro se une a los péptidos y le facilita la absorción o el paso a través del tracto gastrointestinal (Guo

et al., 2014). Sin embargo, la ausencia de diferencias significativas entre el control y las muestras hidrolizadas con bromelina, así como entre los distintos tiempos de incubación, estaría indicando que la hidrólisis producida durante el experimental no ha sido suficiente como para formar péptidos bioactivos con dicha actividad o que los péptidos generados no la ejercen. Otros autores sí que observaron dicha actividad. Por ejemplo, Zheng *et al.* (2019) hidrolizaron la proteína de frijol negro con bromelina y observaron que las muestras con un grado de hidrólisis de 23 % tenían una mayor actividad quelante del hierro en comparación con las muestras control.

Los resultados que se han obtenidos en la actividad quelante del hierro concuerdan con los obtenidos en la bioaccesibilidad (Figura 4) ya que como se ha visto, la bioaccesibilidad no mejora ni aumenta con el grado de hidrólisis. Si se hubiera observado un incremento de la actividad quelante con el grado de hidrólisis probablemente también se hubiera visto en la bioaccesibilidad del hierro, ya que los péptidos facilitarían su paso a través del tracto gastrointestinal.

5. CONCLUSIONES

Los resultados del estudio mostraron que a medida que aumentó el tiempo de incubación, aumentó el grado de hidrólisis proteica de las harinas, siendo este mayor en las harinas hidrolizadas con bromelina comercial en comparación con las harinas hidrolizadas con el extracto acuoso de la corona de la piña.

La hidrólisis afectó de forma significativa al contenido en antinutrientes de las harinas hidrolizadas y a su capacidad antioxidante, mientras que prácticamente no cambió la digestibilidad proteica, la bioaccesibilidad del hierro y su actividad quelante del hierro. Concretamente, se observó que a medida que aumentaba el grado de hidrólisis aumentaba el contenido en compuestos fenólicos totales y taninos, así como su actividad antioxidante. Además, las harinas hidrolizadas con extracto de la corona de la piña mostraron un mayor contenido en inhibidores de tripsina y una menor actividad quelante del hierro.

Por todo ello, se puede afirmar que el extracto acuoso de la corona de la piña es capaz de hidrolizar las proteínas de las harinas de frijol negro y modificar sus propiedades nutricionales y bioactivas, pero en menor medida que la bromelina comercial con la misma actividad enzimática.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256–1262. https://doi.org/10.1021/JF60226A042/ASSET/JF60226A042.FP.PNG_V03
- Amoah, I., Ascione, A., Muthanna, F. M. S., Feraco, A., Camajani, E., Gorini, S., Armani, A., Caprio, M., & Lombardo, M. (2023). Sustainable Strategies for Increasing Legume Consumption: Culinary and Educational Approaches. *Foods*, 12(11), 2265. <https://doi.org/10.3390/FOODS12112265>
- Andrews, M., Briones, L., Jaramillo, A., Pizarro, F., & Arredondo, M. (2014). Effect of calcium, tannic acid, phytic acid and pectin over iron uptake in an in vitro Caco-2 cell model. *Biological Trace Element Research*, 158(1), 122–127. <https://doi.org/10.1007/S12011-014-9911-0/TABLES/1>
- Arnal, M., Gallego, M., Mora, L., & Talens, P. (2023). Vacuum impregnation as a sustainable technology to obtain iron-fortified broad bean (*Vicia faba*) flours. *Food & Function*, 14(11), 5429–5441. <https://doi.org/10.1039/D2FO03587A>
- Arnal Salinas, M. (2020). *Efecto de la cocción y la digestión gastrointestinal in vitro sobre la actividad antioxidante de un hidrolizado de subproductos de tomate*.
- Arshad, Z. I. M., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K., & Loke, S. P. (2014). Bromelain: An overview of industrial application and purification strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(17), 7283–7297. <https://doi.org/10.1007/S00253-014-5889-Y/TABLES/5>
- Avilés-Gaxiola, S., Chuck-Hernández, C., & Serna Saldívar, S. O. (2018). Inactivation Methods of Trypsin Inhibitor in Legumes: A Review. *Journal of Food Science*, 83(1), 17–29. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13985>
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Protein hydrolysates: processes and applications. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227–236.
- Bersuder, P., Hole, M., & Smith, G. (1998). Antioxidants from a heated histidine-glucose model system. I: Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high-performance liquid chromatography. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 181–187. <https://doi.org/10.1007/S11746-998-0030-Y>
- Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2019). Pulses and food security: Dietary protein, digestibility, bioactive and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 53–68. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.08.022>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols* 2019 14:4, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>

- Campbell, N., Shih, F., Hamada, J., & Marshall, W. (1996). Effect of limited proteolysis on the enzymatic phosphorylation of soy protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 759–762.
- Campos-Vega, R., Bassinello, P. Z., Santiago, R. de A. C., & Oomah, B. D. (2018). Dry Beans: Processing and Nutritional Effects. *Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods*, 367–386. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814625-5.00019-4>
- Celmeli, T., Sari, H., Canci, H., Sari, D., Adak, A., Eker, T., & Toker, C. (2018). The Nutritional Content of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Landraces in Comparison to Modern Varieties. *Agronomy*, *8*(9), 166. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY8090166>
- Chen, L., Chen, J., Ren, J., & Zhao, M. (2011). Effects of Ultrasound Pretreatment on the Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein Isolates and on the Emulsifying Properties of Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(6), 2600–2609. <https://doi.org/10.1021/JF103771X>
- Cilla, A., López-García, G., & Barberá, R. (2018). In vitro bioavailability of iron and calcium in cereals and derivatives: A review. *Food Reviews International*, *34*(1), 1–33. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1210631>
- Clavijo, D., Portilla Martínez, M. C., & Quijano Parra, A. (2012). Cinética de la bromelina obtenida a partir de la piña perolera (*Ananas Comosus*) de Lebrija-Santander. *Bistua: Revista de La Facultad de Ciencias Básicas de La Universidad de Pamplona*, *10*(2), 41–49. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90326388008>
- David Troncoso, F., Alberto Sánchez, D., & Luján Ferreira, M. (2022). Production of Plant Proteases and New Biotechnological Applications: An Updated Review. *ChemistryOpen*, *11*(3), e202200017. <https://doi.org/10.1002/OPEN.202200017>
- do Evangelho, J. A., Berrios, J. de J., Pinto, V. Z., Antunes, M. D., Vanier, N. L., & Zavareze, E. da R. (2016). Antioxidant activity of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates. *Food Science and Technology*, *36*, 23–27. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.0047>
- Drulyte, D., & Orlien, V. (2019). The Effect of Processing on Digestion of Legume Proteins. *Foods*, *8*(6). <https://doi.org/10.3390/FOODS8060224>
- el-Adawy, T. A., Rahma, E. H., el-Bedawy, A. A., & Sobihah, T. Y. (2000). Effect of soaking process on nutritional quality and protein solubility of some legume seeds . *Die Nahrung*, *44*(5), 339–343.
- Embaby, H. E. S. (2010). Effect of soaking, dehulling, and cooking methods on certain antinutrients and in vitro protein digestibility of bitter and sweet lupin seeds. *Food Science and Biotechnology*, *19*(4), 1055–1062. <https://doi.org/10.1007/S10068-010-0148-1/METRICS>
- Emmanuel, E., & Deborah, S. (2018). Phytochemical and anti-nutritional studies on some commonly consumed fruits in lokoja, kogi state of Nigeria. *Research Article General Medicine Open Gen Med Open*, *2*(3), 1–5. <https://doi.org/10.15761/GMO.1000135>
- Encuesta Nacional de Nutrición y Alimentación (ENNA)*. (n.d.).

- Enjamio Perales, L., Rodríguez Alonso, P., Valero Gaspar, T., Ruiz Moreno, E., Ávila Torres, J. M., & Varela Moreiras, G. (2017). *Informe sobre Legumbres, Nutrición y Salud*.
- FAO. (2016). *Legumbres: Semillas nutritivas para un futuro sostenible* (1st ed.). FAO. <https://doi.org/10.4060/i5528s>
- FAO. (2023, November 22). *Volumen de legumbres producidas a nivel mundial entre 2010 y 2021 (en millones de toneladas métricas)*. [Gráfica]. In Statista. <https://Es.Statista.Com/Estadisticas/1424942/Produccion-Mundial-de-Legumbres>.
- Fernández-Lucas, J., Castañeda, D., & Hormigo, D. (2017). New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 91–101. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.08.017>
- Flora, S. J. S., & Pachauri, V. (2010). Chelation in Metal Intoxication. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2010, Vol. 7, Pages 2745-2788, 7(7), 2745–2788. <https://doi.org/10.3390/IJERPH7072745>
- Gautam, S. S., K., S., Dash, V., Goyal, A. K., & Rath, G. (2010). Comparative study of extraction, purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant. *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34(2), 67–76. <https://doi.org/10.56808/3027-7922.2170>
- Goertzen, A. D., House, J. D., Nickerson, M. T., & Tanaka, T. (2021). The impact of enzymatic hydrolysis using three enzymes on the nutritional properties of a chickpea protein isolate. *Cereal Chemistry*, 98(2), 275–284. <https://doi.org/10.1002/CCHE.10361>
- Gouseti, O., Larsen, M. E., Amin, A., Bakalis, S., Petersen, I. L., Lametsch, R., & Jensen, P. E. (2023). Applications of Enzyme Technology to Enhance Transition to Plant Proteins: A Review. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(13). <https://doi.org/10.3390/FOODS12132518>
- Graham, P. H., & Ranalli, P. (1997). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*, 53(1–3), 131–146. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(97\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00112-3)
- Guo, L., Harnedy, P. A., Li, B., Hou, H., Zhang, Z., Zhao, X., & FitzGerald, R. J. (2014). Food protein-derived chelating peptides: Biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement. *Trends in Food Science & Technology*, 37(2), 92–105. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2014.02.007>
- Gustavo, T. P. E., Guillermina, R. G. M., Patricia, C. J. T., Efigenia, M. G., & De Lourdes, G. M. (2022). Novel vegetal enzymes used in the obtention of protein hydrolyzates and bioactive peptides derived from various sources of meat and meat by-products. *Value-Addition in Food Products and Processing Through Enzyme Technology*, 293–307. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89929-1.00003-2>
- Hajfathalian, M., Ghelichi, S., García-Moreno, P. J., Moltke Sørensen, A. D., & Jacobsen, C. (2018). Peptides: Production, bioactivity, functionality, and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(18), 3097–3129. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1352564>
- Hartley, B. S. (1960). Proteolytic enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 29(Volume 29, 1960), 45–72. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BI.29.070160.000401/CITE/REFWORKS>

- Huang, S.-J., Tsai, S.-Y., & Mau, J.-L. (2006). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agrocybe cylindracea*. *LWT - Food Science and Technology*, 39, 379–387. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2005.02.012>
- Jamdar, S. N., Deshpande, R., & Marathe, S. A. (2017). Effect of processing conditions and in vitro protein digestion on bioactive potentials of commonly consumed legumes. *Food Bioscience*, 20, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2017.07.007>
- Kaur, T., Kaur, A., & Grewal, R. K. (2015). Kinetics studies with fruit bromelain (*Ananas comosus*) in the presence of cysteine and divalent ions. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5954–5960. <https://doi.org/10.1007/S13197-014-1639-5/TABLES/4>
- Ketnawa, S., & Ogawa, Y. (2019). Evaluation of protein digestibility of fermented soybeans and changes in biochemical characteristics of digested fractions. *Journal of Functional Foods*, 52, 640–647. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2018.11.046>
- Khattab, R., Goldberg, E., Lin, L., & Thiyam, U. (2010). Quantitative analysis and free-radical-scavenging activity of chlorophyll, phytic acid, and condensed tannins in canola. *Food Chemistry*, 122(4), 1266–1272. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.03.081>
- Khattab, R. Y., Arntfield, S. D., & Nyachoti, C. M. (2009). Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments, Part 1: Protein quality evaluation. *LWT*, 42(6), 1107–1112. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2009.02.008>
- Klahan, R., Bundit, Y., Wiboonsirikul, J., Pinsurang, D., & Laohasathit, S. (2021). THE EVALUATION OF PROTEIN DIGESTIBILITY, SAPONIN AND TRYPSIN INHIBITOR CONTENT IN PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vanamei*) FEED, DIGESTED WITH BROMELAIN CRUDE EXTRACT FROM PINEAPPLE WASTE. *Proceedings International Conference on Fisheries and Aquaculture*, 7(1), 72–81. <https://doi.org/10.17501/23861282.2021.7106>
- Konieczny, D., Stone, A. K., Nosworthy, M. G., House, J. D., Korber, D. R., Nickerson, M. T., & Tanaka, T. (2020). Nutritional properties of pea protein-enriched flour treated with different proteases to varying degrees of hydrolysis. *Cereal Chemistry*, 97(2), 429–440. <https://doi.org/10.1002/CCHE.10258>
- Ma, Z., Boye, J. I., Simpson, B. K., Prasher, S. O., Monpetit, D., & Malcolmson, L. (2011). Thermal processing effects on the functional properties and microstructure of lentil, chickpea, and pea flours. *Food Research International*, 44(8), 2534–2544. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2010.12.017>
- MAPA. (2021). *Subdirección General de Análisis, Coordinación y Estadística (SGACE) del MAPA*.
- MAPA. (2022). *Informe del consumo alimentario en España 2022*.
- Mattar, G., Haddarah, A., Haddad, J., Pujola, M., & Sepulcre, F. (2022). New approaches, bioavailability and the use of chelates as a promising method for food fortification. *Food Chemistry*, 373, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.131394>
- Mehta, P. K., & Sehgal, S. (2019). Microbial enzymes in food processing. *Biocatalysis: Enzymatic Basics and Applications*, 255–275. https://doi.org/10.1007/978-3-030-25023-2_13/TABLES/4

- Minekus, M., Alming, 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 & Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Moayed, A., Mora, L., Aristoy, M. C., Safari, M., Hashemi, M., & Toldrá, F. (2018). Peptidomic analysis of antioxidant and ACE-inhibitory peptides obtained from tomato waste proteins fermented using *Bacillus subtilis*. *Food Chemistry*, 250, 180–187. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.01.033>
- Mookerjee, A., & Tanaka, T. (2023). Influence of enzymatic treatments on legume proteins for improved functional and nutritional properties: expansion of legume protein utilization as food ingredients. *Current Opinion in Food Science*, 49. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2022.100974>
- Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L., & Cuadrado, C. (2013). *TABLAS DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS. GUÍA DE PRÁCTICAS*. Pirámide.
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/IJMS22073380>
- Ofuya, Z. M., & Akhidue, V. (2005). The role of pulses in human nutrition: A review. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 9(3), 99–104.
- Ohanenye, I. C., Tsopmo, A., Ejike, C. E. C. C., & Udenigwe, C. C. (2020). Germination as a bioprocess for enhancing the quality and nutritional prospects of legume proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 101, 213–222. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.05.003>
- Ologhobo, A. D., & Fetuga, B. L. (1983). Investigations on the trypsin inhibitor, hemagglutinin, phytic and tannic acid contents of cowpea *Vigna unguiculata*. *Food Chemistry*, 12(4), 249–254. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(83\)90013-4](https://doi.org/10.1016/0308-8146(83)90013-4)
- Panel de consumo de alimentos (PCA)*. (n.d.).
- Pang, W. C., Ramli, A. N. M., & Hamid, A. A. A. (2020). Comparative modelling studies of fruit bromelain using molecular dynamics simulation. *Journal of Molecular Modeling*, 26(6), 1–18. <https://doi.org/10.1007/S00894-020-04398-1/TABLES/3>
- Paquot, M., & Thonart, P. (1986). Alternativas para la utilización de sustratos lignocelulosicos: Hidrolisis acida o enzimatica de la celulosa. *Interferon y Biotecnología*, 3(2), 87–102.
- Purwandari, F. A., Westerbos, C., Lee, K., Fogliano, V., & Capuano, E. (2023). Proximate composition, microstructure, and protein and starch digestibility of seven collections of Jack bean (*Canavalia ensiformis*) with different optimal cooking times. *Food Research International*, 170, 112956. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2023.112956>

- Raju, T. S. (2019). Proteolysis of Proteins. In T. S. Raju (Ed.), *Co- and Post-translational Modifications of Therapeutic Antibodies and Proteins* (pp. 183–202). John Wiley & Sons, Inc.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Ribéreau, S., Aryee, A. N. A., Tanvier, S., Han, J., & Boye, J. I. (2018). Composition, digestibility, and functional properties of yellow pea as affected by processing. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1). <https://doi.org/10.1111/JFPP.13375>
- Rousseau, S., Kyomugasho, C., Celus, M., Hendrickx, M. E. G., & Grauwet, T. (2020). Barriers impairing mineral bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods and the perspectives for food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(5), 826–843. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1552243>
- Rutherford, S. M. (2010). Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in Hydrolysates: A Review. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 93(5), 1515–1522. <https://doi.org/10.1093/JAOAC/93.5.1515>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural del Gobierno de México. (2020, February 29). *Frijol, historia y sabor*. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/frijol-historia-y-sabor>
- Shubham, K., Anukiruthika, T., Dutta, S., Kashyap, A. V., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2020). Iron deficiency anemia: A comprehensive review on iron absorption, bioavailability and emerging food fortification approaches. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 58–75. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.02.021>
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2017). Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. *Food Research International*, 101, 1–16.
- Staniak, M., Książak, J., & Bojarszczuk, J. (2014). Mixtures of Legumes with Cereals as a Source of Feed for Animals. *Organic Agriculture Towards Sustainability*. <https://doi.org/10.5772/58358>
- Sun, X. D. (2011). Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(12), 2447–2459. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2011.02785.X>
- Tacias-Pascacio, V. G., Castañeda-Valbuena, D., Tavano, O., Murcia, Á. B., Torrestina-Sánchez, B., & Fernandez-Lafuente, R. (2023). Peptides with biological and technofunctional properties produced by bromelain hydrolysis of proteins from different sources: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 127244. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.127244>
- Taheri, A., Farvin, K. H. S., Jacobsen, C., & Baron, C. P. (2014). Antioxidant activities and functional properties of protein and peptide fractions isolated from salted herring brine. *Food Chemistry*, 142, 318–326. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.06.113>

- Teixeira-Guedes, C. I., Oppolzer, D., Barros, A. I., & Pereira-Wilson, C. (2019). Impact of cooking method on phenolic composition and antioxidant potential of four varieties of *Phaseolus vulgaris* L. and *Glycine max* L. *LWT*, *103*, 238–246. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.01.010>
- Vergara-Castañeda, H. A., Oomah, B. D., & Campos-Vega, R. (2013). Pulses facing the new age: functional compounds on gene expression and health connection. *Functional Foods: Sources, Biotechnology Applications and Health Challenges*, 1–64.
- Wang, J., Zhao, L.-L., Sun, G.-X., Liang, Y., Wu, F.-A., Chen, Z.-L., & Cui, S.-M. (2011). A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis of rutin. *African Journal of Biotechnology*, *10*(8), 1460–1466. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2077>
- Wisuthiphaet, N., Kongruang, S., & Chamcheun, C. (2015). Production of fish protein hydrolysates by acid and enzymatic hydrolysis. *J. Med. and Bioeng*, *4*.
- Xu, X., Qiao, Y., Shi, B., & Dia, V. P. (2021). Alcalase and bromelain hydrolysis affected physicochemical and functional properties and biological activities of legume proteins. *Food Structure*, *27*, 100178. <https://doi.org/10.1016/J.FOOSTR.2021.100178>
- Zhang, Y. Y., Stockmann, R., Ng, K., & Ajlouni, S. (2023). Hydrolysis of pea protein differentially modulates its effect on iron bioaccessibility, sulfur availability, composition and activity of gut microbial communities in vitro. *Food & Function*, *14*(11), 5182–5195. <https://doi.org/10.1039/D3FO00504F>
- Zheng, Z., Li, J., Li, J., Sun, H., & Liu, Y. (2019). Physicochemical and antioxidative characteristics of black bean protein hydrolysates obtained from different enzymes. *Food Hydrocolloids*, *97*, 105222. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2019.105222>
- Zheng, Z., Wang, M., Li, J., Li, J., & Liu, Y. (2020). Comparative assessment of physicochemical and antioxidative properties of mung bean protein hydrolysates. *RSC Advances*, *10*(5), 2634–2645. <https://doi.org/10.1039/C9RA06468K>