



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

FoodUPV
INSTITUTO DE INGENIERIA DE ALIMENTOS

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos
(FoodUPV)

Impacto del procesado y de la fermentación con *Pleurotus ostreatus* sobre la composición nutricional, contenido de anti-nutrientes y digestibilidad de la judía de herradura (*Phaseolus vulgaris* L.)

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos

AUTOR/A: Aróstegui Romanos, Ibai

Tutor/a: Muñoz Pina, Sara

Cotutor/a: Andrés Grau, Ana María

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

IMPACTO DEL PROCESADO Y DE LA FERMENTACIÓN CON *PLEUROTUS OSTREATUS* SOBRE LA COMPOSICIÓN NUTRICIONAL, CONTENIDO DE ANTI-NUTRIENTES Y DIGESTIBILIDAD DE LA JUDÍA DE HERRADURA (*PHASEOLUS VULGARIS* L.)

Ibai Aróstegui Romanos, Sara Muñoz Pina, Ana Heredia, Ana Andrés.

RESUMEN

Este trabajo se centra en evaluar el impacto del procesado y la fermentación con *Pleurotus ostreatus* sobre la calidad nutricional y la digestibilidad de la judía de herradura (*Phaseolus vulgaris* L.), una judía típica de la comunidad Valenciana. Dado el aumento alarmante de la obesidad infantil, consecuencia de múltiples factores entre los que se encuentran el creciente consumo de snacks ricos en carbohidratos y grasas saturadas, se plantea el desarrollo de nuevos snacks a partir de legumbres fermentadas, como alternativa viable, saludable y sostenible.

La fermentación de esta legumbre implicó un aumento significativo en el contenido proteico, pasando de un 16-17% a un 22%, junto con un incremento notable de entre un 30 a 50% en aminoácidos esenciales como la leucina y valina. Además, se redujo el contenido de carbohidratos, lípidos y fitatos.

Tras la simulación de la digestión in vitro, las judías fermentadas mostraron una mejora en la digestibilidad de las proteínas y carbohidratos, alcanzando un 90% de proteólisis y un 80% de glucólisis. La fermentación también incrementó la capacidad de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), alcanzando el 66%, lo que resalta su potencial para combatir la hipertensión. Estos resultados sugieren que las judías fermentadas podrían ser utilizadas como ingrediente para el desarrollo de snacks saludables dirigidos a la población infantil en general y en especial a los grupos con sobrepeso.

ABSTRACT

This work is focused on evaluating the impact of processing and fermentation with *Pleurotus ostreatus* on the nutritional quality and digestibility of the horseshoe bean (*Phaseolus vulgaris* L.), a typical bean of the Valencian community. Given the alarming increase in childhood obesity, a consequence of multiple factors including the growing consumption of snacks rich in carbohydrates and saturated fats, the development of new snacks from fermented legumes is proposed as a viable, healthy and sustainable alternative.

Fermentation of this legume resulted in a significant increase in protein content, from 16-17% to 22%, along with a notable increase of 30-50% in essential

amino acids such as leucine and valine. In addition, the content of carbohydrates, lipids and phytates was reduced.

After simulated in vitro digestion, the fermented beans showed an improvement in protein and carbohydrate digestibility, reaching 90% proteolysis and 80% glycolysis. Fermentation also increased the angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition capacity, reaching 66%, highlighting its potential to combat hypertension. These results suggest that fermented beans could be used as an ingredient for the development of healthy snacks for children in general and especially for overweight groups.

RESUM

Aquest treball es centra en avaluar l'impacte del processament i la fermentació amb *Pleurotus ostreatus* sobre la qualitat nutricional i la digestibilitat del fesol de ferradura (*Phaseolus vulgaris* L.), un fesol típic de la Comunitat Valenciana. Donat l'augment alarmant de l'obesitat infantil, conseqüència de múltiples factors entre els quals es troben el creixent consum de snacks rics en carbohidrats i greixos saturats, es planteja el desenvolupament de nous snacks a partir de llegums fermentades, com a alternativa viable, saludable i sostenible.

La fermentació d'aquesta llegum va implicar un augment significatiu en el contingut proteic, passant d'un 16-17% a un 22%, juntament amb un increment notable d'entre un 30 a 50% en aminoàcids essencials com la leucina i valina. A més, es va reduir el contingut de carbohidrats, lípids i fitatos.

Després de la simulació de la digestió in vitro, els fesols fermentats van mostrar una millora en la digestibilitat de les proteïnes i carbohidrats, aconseguint un 90% de proteòlisi i un 80% de glucòlisi. La fermentació també va incrementar la capacitat d'inhibició de l'enzim convertidor d'angiotensina (ECA), aconseguint el 66%, la qual cosa ressalta el seu potencial per a combatre la hipertensió. Aquests resultats sugereixen que els fesols fermentats podrien ser utilitzats com a ingredient per al desenvolupament de snacks saludables dirigits a la població infantil en general i especialment als grups amb sobrepès.

1. INTRODUCCIÓN

Es ampliamente conocido que, durante los últimos años, la obesidad se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, afectando tanto a adultos como a niños y adolescentes. Este fenómeno se ha acelerado debido a cambios en los estilos de vida y patrones alimentarios, marcados por un aumento en el consumo de alimentos altamente procesados, ricos en grasas y azúcares, y una disminución en la actividad física. La obesidad infantil, en particular, es alarmante, ya que no solo afecta el bienestar físico y emocional de los niños, sino que también los predispone a una serie de enfermedades crónicas en la adultez, como diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. La obesidad infantil también se asocia con una disminución de la inmunidad antitumoral, lo que puede aumentar el riesgo de cáncer. Estos hallazgos subrayan la urgencia de abordar la obesidad infantil desde una perspectiva integral que incluya intervenciones dietéticas efectivas (Smith, J. D., Fu, E., & Kobayashi, M. A., 2020).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2024), en 2022, 2500 millones de adultos tenían sobrepeso (43% de la población de adultos) de los cuales 890 millones eran obesos (16% de la población de adultos), 37 millones de niños menores de 5 años tenían sobrepeso y más de 390 millones de niños y adolescentes de 5 a 19 años tenían sobrepeso, de los cuales 160 millones eran obesos. Además, desde 1990, la obesidad se ha duplicado con creces entre los adultos de todo el mundo, y se ha cuatuplicado entre los adolescentes.

A pesar de los conocidos beneficios de la dieta mediterránea, incluso en los países del sur de Europa, donde esta dieta es tradicional, se observan algunas de las tasas más elevadas de obesidad infantil en el continente (Lavie et al., 2019).

Paralelamente, durante las últimas décadas, el consumo de “snacks” ha aumentado significativamente. Entre los países que más “snacks” consumen, España se encuentra en tercer lugar, alcanzando un gasto de 57,5 € per cápita al año (Marín-Guerrero, A. C., 2008). Estos alimentos, generalmente altos en carbohidratos de rápida absorción, grasas saturadas y sal, son poco saciantes y, además, no satisfacen las necesidades nutricionales de los niños y contribuyen al aumento de peso. Esta preocupación ha llevado a padres, pediatras, fabricantes de alimentos e investigadores a buscar alternativas más saludables. Los consumidores están cada vez más interesados en productos que no solo sean sabrosos sino también nutritivos, llevando a los fabricantes a desarrollar “snacks” con un valor nutricional mejorado mediante el uso de ingredientes alternativos (Mattes, 2018).

En este contexto, las legumbres se presentan como una opción viable para desarrollar "snacks" saludables y saciantes. Dentro del amplio espectro de leguminosas que existen, las judías (*Phaseolus vulgaris* L.) son una fuente rica en proteínas, fibra, carbohidratos complejos y antioxidantes. Además, son sostenibles desde el punto de vista medioambiental, ya que su cultivo contribuye a la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero y mejora la salud del suelo. Sin embargo, las legumbres también contienen factores antinutricionales que pueden afectar su calidad nutricional y biodisponibilidad (Proserpio et al., 2020).

Una solución innovadora para mejorar el perfil nutricional de las legumbres es la fermentación. Este proceso biotecnológico no solo reduce la cantidad de antinutrientes mediante la biotransformación, sino que también puede aumentar el contenido de proteínas y otros componentes funcionales. Recientemente, se han investigado métodos de fermentación en estado sólido para legumbres como lentejas, soja y quinoa, con resultados prometedores. Dentro del amplio espectro de microorganismos que pueden ser utilizados en la fermentación, los hongos, en particular el *Pleurotus ostreatus*, ofrece ciertas ventajas debido a su elevado contenido proteico y su capacidad para mejorar la calidad nutricional del producto final (Asensio-Grau et al., 2020).

Así, el objetivo principal de este trabajo es determinar cómo la fermentación en estado sólido afecta al perfil nutricional de las judías de Herradura (*Phaseolus Vulgaris* L.), variedad tradicional de la Comunidad Valenciana, así como evaluar su digestibilidad mediante un sistema estático de digestión *in vitro*. Este enfoque busca demostrar el potencial de las judías de herradura fermentadas como un ingrediente innovador para la creación de productos alimentarios saludables, nutritivos y sostenibles, en concreto, un "snack" que pueda contribuir a la reducción de la obesidad infantil.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales y reactivos

Las judías Herradura (*Phaseolus vulgaris* L.) se adquirieron en tiendas locales de Valencia, España. La cepa *Pleurotus ostreatus* (CECT20311) se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo. Para las distintas determinaciones se utilizaron los siguientes reactivos: ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, cloruro sódico, ácido tioglicólico, ácido fítico, 2,2'-bipiridina, acetilacetona, ácido ascórbico, acetato de etilo, ácido fórmico, DPPH, ABTS, reactivo de Folin-Ciocalteu, TPTZ, ácido gálico, Trolox, micopeptona y cloranfenicol de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE.UU.). Para la digestión, se utilizaron reactivos como pepsina de mucosa gástrica porcina (3200-4500 U/mg, P6887), pancreatina de páncreas porcino (8 x USP, P7545), éster metílico de p-toluenosulfonil-L-arginina,

bilis bovina (B3883), diversas sales de grado analítico, ácido bórico, ácido clorhídrico (37%), ácido sulfúrico (95-97%), hidróxido sódico, D-(+)-glucosa ($\geq 99.5\%$), etanol (96%) e invertasa de levadura (Grado VII, ≥ 300 unidades/mg sólido, I4504) obtenidos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE.UU.). Otros reactivos, como ácido acético glacial, ácido clorhídrico concentrado, etanol absoluto, éter etílico, carbonato sódico, sulfato férrico de amonio dodecahidratado y sal EDTA disódica de calcio, se obtuvieron de Panreac AppliChem (Barcelona, España). El ácido nítrico (70%), el acetonitrilo grado HPLC, el metanol grado HPLC, el cloruro férrico hexahidratado, el acetato sódico trihidratado y el persulfato potásico se obtuvieron de Honeywell Fluka (Morris Plains, NJ, EE.UU.).

2.2. Fermentación fúngica en estado sólido

La fermentación en estado sólido se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Sánchez-García et al., 2023. Antes de la inoculación con *Pleurotus ostreatus*, las judías se hidrataron durante 8 horas a temperatura ambiente en una proporción 1:6. Tras la hidratación, se trocearon y se escaldaron durante 2 minutos. Seguidamente, se enfriaron con abundante agua. A continuación, las judías se esterilizaron en autoclave (JP Selecta™, Barcelona, España) durante 20 minutos a 121°C. Posteriormente, se colocaron 50 g de judías en recipientes de fermentación con un filtro T1 y se inocularon con 5 mL de cultivo iniciador de *Pleurotus ostreatus*. El cultivo iniciador se preparó en un medio líquido compuesto por un 2% de glucosa, un 2% de extracto de malta y un 0,1% de micopeptona, agitado horizontalmente a 25°C durante 14 días en una incubadora digital (JP Selecta™). La incubación se mantuvo durante 10 días a 25°C en una incubadora digital (JP Selecta™).

2.3. Composición proximal

Para evaluar los cambios nutricionales debidos a la fermentación o al procesado previo, se analizaron cinco muestras diferentes: judías crudas (JCru), judías remojadas durante 16 horas (JRem), judías escaldadas y esterilizadas en autoclave durante 20 minutos a 121°C (JAut), judías escaldadas, esterilizadas en autoclave durante 20 minutos a 121°C e incubadas 10 días (JAut10) y judías fermentadas en las mismas condiciones que las JAut10 pero inoculadas con *Pleurotus ostreatus* (JFer). El contenido de humedad, grasa, cenizas y proteínas de las judías se analizó según los métodos oficiales (AOAC, 2000). La humedad se evaluó midiendo el cambio de peso de las muestras antes y después del secado hasta obtener una masa constante, el contenido de grasa se determinó mediante el método Soxhlet, el contenido de proteínas se calculó a partir del contenido de nitrógeno total utilizando el método Kjeldahl con un factor de conversión de 6,25, el contenido de cenizas se midió calcinando las muestras en un horno de mufla a 550°C durante 10 horas. Por último, los hidratos de carbono se calcularon por diferencia.

2.4. Perfil de aminoácidos

El perfil de aminoácidos de las judías se determinó realizando previamente dos tipos de extracción, una hidrólisis alcalina (para la determinación de triptófano) y otra ácida (para la determinación del resto de aminoácidos). Para la hidrólisis alcalina, se mezclaron 0,2 g de la muestra con 10 mL de hidróxido de litio monohidratado 4,3 M y se calentaron a 120 °C durante 16 horas. Para la hidrólisis ácida, se mezclaron 0,2 g de la muestra con 10 mL de HCl 6 M y se calentaron a 110 °C durante 24 horas. Después de la hidrólisis, las muestras se evaporaron y se reconstituyeron con HCl 20 mM. Ambos hidrolizados se filtraron a través de un filtro de celulosa de 0,2 μm y posteriormente se procedió a su derivatización utilizando el kit comercial AccQ-Tag de Waters (Muñoz-Pina et al. 2024).

Las muestras se analizaron utilizando un HPLC Agilent Serie 1200 con un detector de matriz de diodos (Agilent, Palo Alto, CA, EE.UU.). Los compuestos identificados se cuantificaron mediante una curva de calibración, y los resultados se expresaron en mg de aminoácidos por gramo de materia seca.

2.5. Estructura secundaria de las proteínas

Los cambios en la estructura secundaria de la proteína aislada de judía como consecuencia del procesado se evaluó siguiendo el método descrito por Shrestha et al. (2023), utilizando espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) (espectrómetro Cary 630, Agilent Technologies Inc., EE.UU.). Las proteínas aisladas se extrajeron de las judías según el procedimiento descrito por Sánchez-García et al., 2023, y, posteriormente, se procedió a su liofilización (Telstar, Lyoquest-55, Terrassa, España).

Para el análisis FTIR, los aislados proteicos desecados se colocaron en una célula de diamante y se escanearon 120 veces dentro del rango de 600 a 4000 cm^{-1} a una resolución de 4 cm^{-1} . La región de la amida I (1600-1700 cm^{-1}) se desconvolucionó utilizando el programa OriginPro 2024, se identificaron los picos gaussianos y se asignaron a estructuras secundarias de proteínas específicas basándose en los valores de la bibliografía (Beck et al., 2017). Los picos determinados fueron: a 1638 cm^{-1} correspondiente a la conformación lámina β , a 1654 cm^{-1} la α hélice, a 1663 cm^{-1} la β giro y, por último a 1680 cm^{-1} se encontró la lámina β antiparalela. Por otro lado, se observaron picos adicionales que indicaban agregados de proteínas y absorciones de cadenas laterales de aminoácidos en 1625-1610 cm^{-1} (A1) y 1695-1690 cm^{-1} (A2).

2.6. Contenido total de biomasa en muestras fermentadas

Para determinar el contenido final de biomasa después de la fermentación, se mezcló una muestra seca de 100 mg con 2,4 mL de ácido sulfúrico al 72% a 25°C durante 24 horas. A continuación, las muestras se diluyeron con 55 mL de agua

destilada y se esterilizaron a 121°C durante 1.30 horas. Se combinó una alícuota de 1 mL del hidrolizado neutralizado con 1 mL de acetilacetona, se calentó en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos, se enfrió y se mezcló con 6 mL de etanol y 1 mL de reactivo de Ehrlich. La mezcla se incubó a 65°C durante 10 minutos y se registró la absorbancia a 530 nm. (Sánchez-García et al., 2023). Los resultados se expresaron en mg de glucosamina por g de materia seca.

2.7. Actividad inhibitoria de la tripsina

Se evaluó la actividad inhibidora de la tripsina siguiendo el método de Millar K. A. et al. (2019). Se extrajo 1 g de judías con 50 mL de NaOH 0,01 M durante 1 hora a temperatura ambiente, manteniendo el pH entre 8,4 y 10,0. Luego, se diluyeron los extractos para alcanzar niveles de inhibición de tripsina del 30-70%. En un tubo de ensayo, se añadieron 2 mL de solución de tripsina (0,5 g de tripsina de páncreas porcino en 500 mL de HCl 0,001 M) ,1 mL del extracto diluido y 1 mL de agua destilada y se mantuvieron a 37°C. Después de 10 minutos, se añadió a cada tubo 5 mL de solución de BAPNA precalentada a 37°C (preparada disolviendo 80 mg de BAPNA en 2 mL de DMSO y diluyéndolo a 200 mL con tampón Tris 0,05 M), y se agitaron en un vórtex. Las muestras se incubaron nuevamente durante 10 minutos a 37°C, tras lo cual se añadió 1 mL de ácido acético al 30% para detener la reacción. La absorbancia, debido a la liberación de p-nitroanilina, se midió a 410 nm. La actividad inhibidora de la tripsina se expresó como unidades de inhibición de la tripsina (UIT) por miligramo de materia seca.

2.8. Digestión estática in vitro

Los 5 tipos de muestras según el tratamiento (judías crudas (JCru), judías remojadas durante 16 horas (JRem), judías escaldadas y esterilizadas en autoclave durante 20 minutos a 121°C (JAut), judías escaldadas, esterilizadas en autoclave durante 20 minutos a 121°C e incubadas 10 días (JAut10) y judías fermentadas en las mismas condiciones que las JAut10 pero inoculadas con *Pleurotus ostreatus* (JFer)) fueron digeridas simulando las fases oral, gástrica e intestinal para un adulto sano siguiendo el protocolo INFOGEST. Posteriormente para las determinaciones, sólo se emplearon las muestras fermentadas y autoclavadas digeridas debido a que es el procesado que más se asemeja a la cocción típica de las legumbres (Minekus et al., 2014).

Fase oral: Se mezclaron 5 g de muestra con 5 mL de FES (fluido de Saliva simulado) atemperado a 37°C. Posteriormente, se incubaron con agitación a 37°C durante 2 minutos.

Fase Gástrica: La mezcla de fase oral se combinó con el mismo volumen de Fluido Gástrico Simulado (FGS) que contenía pepsina porcina a 2.000 U/mL y se

ajustó a pH 3,0 con HCl 1M. Las muestras se incubaron con agitación a 37°C durante 2 horas y el pH se fue reajustando periódicamente a pH 3,0.

Fase Intestinal: La mezcla de la fase gástrica se combinó con un volumen igual de fluido intestinal simulado (FIS) y se ajustó a pH 7,0 con NaOH 1M. El FIS contenía pancreatina y sales biliares con actividades finales de 5,35 U/mg y 10 mM respectivamente. Las muestras se incubaron con agitación a 37°C durante 2 horas, ajustando el pH a 7,0 periódicamente. Una vez acabada la incubación, se añadieron 4 mL de inhibidor Bowman-Birk (0,05 g/L) para inhibir la actividad enzimática. Para finalizar, se tomó alícuotas del sobrenadante una vez las muestras fueron centrifugadas 10 minutos a 8000 G a 4°C. Estas muestras fueron congeladas para las posteriores determinaciones. Para

2.9. Contenido de ácido fítico

Se evaluó el contenido de ácido fítico antes y después de la digestión *in vitro* utilizando el método descrito por Sánchez-García et al., (2023). Para ello, se mezclaron 50 mg de las muestras no digeridas con 10 mL de HCl 0,2 M y se dejaron reposar toda la noche a 4°C para extraer e hidrolizar el ácido fítico. En el caso de las muestras digeridas, el análisis se realizó sobre la fracción bioaccesible. Se tomó una alícuota de 500 µL del extracto de las judías y del digerido y se añadió 1 mL de solución férrica (0,2 g de dodecahidrato de sulfato amónico de hierro (III) disuelto en 100 mL de ácido clorhídrico 2 M y completado hasta 1 L con agua destilada). La mezcla se incubó en un baño de agua hirviendo durante 30 minutos, luego se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó durante 30 minutos a 3000 g. Una alícuota de 1 mL del sobrenadante se mezcló con 1,5 mL de solución de 2,2'-bipiridina (10 g de 2,2'-bipiridina y 10 mL de ácido tioglicólico disueltos en agua destilada y completados hasta 1 L). Los resultados se cuantificaron como mg de ácido fítico por gramo de base seca utilizando una curva de calibrado preparada a partir de una solución madre de 1,3 mg/mL de ácido fítico, diluida con ácido clorhídrico 0,2 M

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

Para llevar a cabo todos los ensayos, primero se realizó una extracción etanólica de los compuestos fenólicos siguiendo el método descrito por Caprioli et al., (2018). Se mezclaron 20 mL de etanol al 70% con 5 g de la muestra sólida. Luego, se ajustó el pH a 2 añadiendo HCl 2N y se sometió la muestra a sonicación durante 120 minutos a 20°C. Tras este proceso, la muestra se centrifugó a 8000 g durante 15 minutos. Esta extracción se repitió dos veces y los sobrenadantes obtenidos se combinaron en una sola alícuota. Finalmente, el extracto se filtró utilizando un filtro de PTFE de 0,45 µm.

Para determinar el contenido total de fenoles (TPC), se utilizó el método Folin-Ciocalteu según Aranibar et al., (2018). Se mezclaron 10 μ L de cada extracto con 1,58 mL de agua bidestilada. Después, se añadieron 100 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu y se agitó durante 3 minutos. Posteriormente, se incorporaron 300 μ L de Na₂CO₃ al 20%, se incubó la mezcla a temperatura ambiente en oscuridad durante 60 minutos y se midió la absorbancia a 765 nm (UV/vis, Beckman Coulter du 730). Se preparó una curva estándar de ácido gálico de 0 a 500 mg/L ($r^2=0.997$) y los resultados se expresaron en miligramos de equivalente de ácido gálico (GAE) por gramo de muestra seca.

Para evaluar la actividad antioxidante, se emplearon tres métodos diferentes: ABTS, DPPH y FRAP, siguiendo el procedimiento de Thaipong et al., (2006). Se utilizó el mismo extracto etanólico mencionado anteriormente. Los resultados de todos los métodos se expresaron en miligramos de trolox por gramo de muestra seca, utilizando una curva estándar con Trolox como referencia.

Finalmente, el contenido de taninos en los extractos de habas se determinó mediante el ensayo de vanilina acidificada descrito por Downey & Hanlin, (2010). Se mezclaron 50 μ L del extracto con 200 μ L de reactivo de vanilina (compuesto por 3% de vanilina y 14% de HCl en MeOH) y se dejó reaccionar durante 20 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 500 nm (UV/vis, Beckman Coulter du 730) y los resultados se expresaron en equivalentes de catequina (mg CAE/g de muestra seca).

2.11. Contenido total de azúcares reductores y grado de glucólisis

La determinación de los azúcares reductores se realizó de distinta manera para muestras digeridas y muestras sin digerir. Para estas últimas, el análisis se realizó siguiendo la metodología propuesta por Armellini et al., 2019. Para la extracción de los azúcares, 0,3 g de la muestra se mezclaron con 2 mL de etanol al 80% y se dejaron reposar durante 30 minutos. A continuación, se centrifugó la mezcla a 5000 g durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante. Se combinó una alícuota de 500 μ L de la muestra con 1 mL de reactivo DNS (10 g/L de ácido 3,5-dinitrosalicílico con 300 g de tartrato sódico potásico tetrahidratado) y 16 g de NaOH. La mezcla se calentó a 100 °C durante 5 minutos y después se enfrió a temperatura ambiente. Las muestras se diluyeron con 6 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 530 nm. Los resultados se expresaron como mg de glucosa por gramo de muestra seca.

Sin embargo, para las muestras digeridas, se mezcló 1 mL del extracto digerido con 4 mL de etanol. A continuación, se añadieron 50 μ L de esta mezcla en 250 μ L de una mezcla de amilogucosidasa al 1% e invertasa al 1% en tampón acetato a pH 5,2 y se incubaron a 37 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se añadieron 750 μ L de reactivo DNS y la mezcla se calentó a 100 °C durante 15

minutos. Por último, se añadieron 4 mL de agua desionizada y se midió la absorbancia a 530 nm.

El grado de glucólisis se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de glucólisis} = \frac{\text{g glucosa libre en el extracto digerido}}{\text{g almidón en la muestra no digerida}}$$

2.12. Proteína soluble total (TCA)

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

2.13. Actividad inhibitoria de la encima convertidora de angiotensina (ECA)

Se evaluó el porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en las muestras tanto antes como después de la digestión in vitro, siguiendo la metodología de Hernández-Olivas et al., (2022).

El reactivo ECA (25 mU/mL) y el sustrato Hip-His-Leu (5 mM) se disolvieron por separado en un tampón de Tris 0.15 M con NaCl 0.3 M, ajustando el pH a 8.3. Se incluyeron tres controles: (i) 100 µL de ACE + 40 µL de agua destilada, (ii) 140 µL de agua destilada, y (iii) 100 µL de agua destilada + 40 µL de extracto/digestión de muestra. Las muestras consistieron en 100 µL de ACE + 40 µL de extracto o del sobrenadante de las muestras de la digestión. Luego, se incubaron a 37 °C durante 5 minutos. Se añadieron 100 µL de sustrato a cada tubo y se continuó la incubación durante 30 minutos a la misma temperatura. La reacción se detuvo agregando 150 µL de HCl 1 M, seguido de la adición de 1 mL de acetato de etilo y una mezcla vigorosa en un agitador vortex. Después de centrifugar las muestras a 1200 g durante 10 minutos, se recogieron 750 µL del sobrenadante y se transfirieron a tubos limpios. El acetato de etilo en el sobrenadante se evaporó mediante agitación suave a 80 °C. El ácido hipúrico sólido restante en los tubos se disolvió en 1 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 228 nm.

El porcentaje de inhibición final se calculó usando la siguiente ecuación.

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

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

2.14. Análisis estadístico

Se realizaron todos los experimentos en triplicado y los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa Statgraphics Centurion-XIX. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$) para identificar grupos homogéneos.

3. RESULTADOS

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

La Tabla 1 presenta la composición proximal de las judías de Herradura antes y después de la fermentación en estado sólido (FES) con *Pleurotus ostreatus*. Además, se incluye el contenido total en compuestos fenólicos, actividad antioxidante y algunos compuestos antinutricionales como los taninos y fitatos. Por último, también se muestra la actividad inhibidora de la tripsina. Dado que la FES incluye el remojo y el autoclavado (procesos que pueden afectar independientemente a las propiedades nutricionales), también se analizaron como controles muestras de judías crudas (JCru), judías remojadas (JRem), judías autoclavadas (JAut) y judías autoclavadas incubadas durante 10 días (JAut10) para discernir los cambios atribuibles específicamente a la actividad fúngica. La fermentación se dio por terminada a los 10 días llegando a un contenido total en biomasa del 42,52 mg glucosamina/g b.s., valor superior al obtenido en otras legumbres como por ejemplo la lenteja Pardina (Sánchez-García et al., 2023).

En términos generales, el procesado parece no alterar significativamente la composición, sin embargo, se encontraron cambios significativos tras la fermentación de las judías de Herradura. La fermentación produjo un aumento significativo en el porcentaje total de proteínas del 16-17% al 22%. Este aumento coincide con otros estudios realizados en otras legumbres y puede ser debido tanto al proceso implícito de la fermentación (17-42%) (Espinosa-Páez et al., 2017; Muñoz-Pina et al., 2024). Por otro lado, el contenido de lípidos disminuyó significativamente tras la fermentación reduciéndose a la mitad, pasando del 0,8-0,9% al 0,48% debido al metabolismo microbiano, ya que, durante la fermentación, los microorganismos metabolizan los lípidos presentes en las judías como fuente de energía, reduciendo así su concentración inicial (Granito et al., 2002).

Tabla 1. Composición proximal, biomasa, taninos, compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP) y antinutrientes (fitatos, taninos y actividad inhibidora de la tripsina) de judías de Herradura crudas (JCru), remojadas (JRem), esterilizadas en autoclave (JAut), esterilizadas en autoclave incubadas durante 10 días (JAut10) y fermentadas (JFerm).

	JCru	JRem	JAut	JAut10	JFer
<u>Componentes mayoritarios, azúcares reductores, almidón y biomasa</u>					
Humedad (g/100 g b.s.)	7,57±0,03 ^a	60,0±0,7 ^b	62,9±1,3 ^b	60±4 ^b	63,8±0,8 ^b
Cenizas (g/100g b.s.)	4,20±0,09 ^b	6,5 ± 0,8 ^c	2,4±0,4 ^a	3,64±0,14 ^{ab}	4,4±0,5 ^b
Proteínas (g/100 g b.s.)	16,7±1,1 ^a	16,2±0,5 ^a	17,6±1,4 ^a	17,3±0,3 ^a	21,4±1,3 ^b
Lípidos (g/100 g b.s.)	0,78±0,07 ^b	0,94±0,08 ^c	0,9± 0,2 ^{bc}	0,78±0,03 ^b	0,48±0,08 ^a
Carbohidratos (g/100 g b.s.)	78,4±1,3 ^b	76,4±1,4 ^{ab}	79,1±2,0 ^b	78,3±0,5 ^b	73,8±1,9 ^a
Azúcares reductores (g glucosa/ 100 g b.s.)	0,11±0,03 ^a	0,38±0,17 ^c	0,18±0,03 ^{ab}	0,26±0,02 ^{bc}	4,62±0,07 ^d
Almidón (g/ 100 g b.s.)	62,9±1,5 ^b	61,0±3,1 ^{ab}	63,7±2,3 ^b	62,9±0,6 ^b	58,3±2,6 ^a
Biomasa (mg glucosamina/g b.s.)	–	–	–	–	40,5±1,4
<u>Componentes minoritarios y capacidad antioxidante</u>					
TPC (mg CAE/ 100g b.s.)	3,93±0,19 ^c	1,4±1,8 ^{ab}	1,26±0,15 ^{ab}	1,19±0,05 ^a	1,50±0,13 ^b
ABTS (mg TE/ 100g b.s.)	13,6±0,5 ^c	5,1±0,5 ^a	6,4±0,7 ^b	5,3±0,3 ^a	4,7±0,4 ^a
FRAP (mg TE/ 100g b.s.)	4,47±0,17 ^d	1,87±0,02 ^{ab}	2,9±0,2 ^c	2,08±0,02 ^b	1,6±0,2 ^a
DPPH (mg TE/ 100g b.s.)	3,4±0,5 ^b	1,25±0,05 ^a	1,1±0,2 ^a	0,86±0,05 ^a	1,0±0,2 ^a
Taninos (mg catequina/ 100g b.s.)	4,6±0,6 ^c	1,24±0,15 ^b	0,43±0,10 ^a	0,92±0,02 ^{ab}	0,45±0,13 ^a
Fitatos (mg ácido fítico/ 100g b.s.)	12,67±0,01 ^d	9,8±0,8 ^c	4,0±1,1 ^b	4,0±1,3 ^b	0,4±1,5 ^a
Actividad inhibitoria de la tripsina (TUI/mg DB)	85,6±5,1 ^c	69,5±2,2 ^b	1,41±0,02 ^a	1,00±0,06 ^a	0,17±0,06 ^a

Los datos que se presentan son valores medios triplicados. Las letras minúsculas indican las diferencias significativas entre los valores de las 3 muestras estudiadas con un nivel de significación del 95%

Los carbohidratos totales disminuyeron del 78% al 73% aproximadamente, ya que, sirven como fuente de energía para el crecimiento del micelio, y algunos se convierten en proteínas complejas, péptidos o aminoácidos libres.

La fermentación también provocó un aumento significativo del contenido de cenizas en comparación con las judías autoclavadas y remojadas. Esto contrasta con otras legumbres, como las habas, en las que suele observarse una disminución del contenido total de cenizas tras la fermentación. Esta variación se debe probablemente a diferencias en la forma de los componentes minerales de la ceniza, que depende considerablemente de su forma original en el alimento, lo que altera su peso y su capacidad de volatilización (Muñoz-Pina et al., 2024).

Respecto a los compuestos fenólicos totales, se observa una disminución de estos como consecuencia del procesado. Esta bajada se debe principalmente al remojo de las judías debido a la solubilidad de los compuestos fenólicos en agua (Xu & Chang, 2008). Por otro lado, la actividad antioxidante de las judías procesadas también cambió en comparación a las muestras crudas, lo que indica que el procesamiento, principalmente el remojo, altera negativamente los compuestos con actividad antioxidante. Los principales mecanismos implicados incluyen la formación de enlaces iónicos durante la demetoxilación de la pectina, la reticulación de los compuestos fenólicos con la pared primaria y la laminilla media, las interacciones polifenol-proteína y la interacción de los compuestos fenólicos y la fibra (Ma et al., 2016).

Por otro lado, se puede apreciar que las judías crudas contenían niveles moderados de antinutrientes como taninos y fitatos, junto con una elevada actividad inhibidora de la tripsina, en consonancia con la bibliografía existente (Carbas et al., 2020). Los tratamientos térmicos como el autoclavado redujeron eficazmente los taninos hasta en un 90% debido a su sensibilidad al calor. No obstante, la fermentación no disminuyó más los niveles de taninos a pesar de la presencia de actividad fúngica.

Sin embargo, el proceso de fermentación si redujo significativamente el contenido de fitatos en un 97% y la actividad inhibidora de la tripsina en un 99,8%. Por encima de las reducciones logradas únicamente mediante el remojo o el tratamiento térmico.

3.2. Estudio de los cambios en el perfil de aminoácidos tras la fermentación

La Tabla 2 presenta la composición en aminoácidos de las judías de herradura crudas (JCru), remojadas (JRem), autoclavadas (JAut), autoclavadas e incubadas 10 días (JAut10) y fermentadas (JFer).

Dentro de los aminoácidos encontramos dos grupos claramente diferenciados. Por un lado, se encuentran los aminoácidos esenciales (EAA), que

son aquellos que el cuerpo humano no puede sintetizar y, por lo tanto, deben ser obtenidos a través de la dieta. Por otro lado, encontramos los aminoácidos no esenciales (NEAA), que son aquellos que el cuerpo humano puede sintetizar por sí mismo, por lo que no es necesario obtenerlos exclusivamente a través de la dieta.

Tabla 2. Perfil de aminoácidos (mg de AA / g b.s.) de judías de herradura crudas (JCru), remojadas (JRem), autoclavadas (JAut), autoclavadas e incubadas 10 días (JAut10) y fermentadas (JFer)

Aminoácidos (mg AA / g b.s.)	JCru	JRem	JAut	JAut10	JFer
Ácido Aspártico	25,8±0,5 ^a	24,4±1,1 ^a	27,1±1,9 ^{ab}	27,3±3,3 ^{ab}	30,4±2,6 ^b
Serina	11,0±0,2 ^a	10,7±0,5 ^a	14,1±1,8 ^c	11,9±0,3 ^b	13,2±1,2 ^{bc}
Ácido glutámico	33,20±0,04 ^b	29,8±0,2 ^a	34,0±4,1 ^b	34,2±2,8 ^b	33,7±2,9 ^b
Glicina	10,84±0,04 ^{ab}	10,3±0,2 ^a	11,6±1,6 ^b	11,7±0,9 ^b	13,9±0,9 ^c
Histidina	6,3±0,6 ^a	9,2±0,7 ^c	6,4±0,6 ^a	8,8±2,1 ^b	7,4±0,1 ^{ab}
Arginina	11,3±0,4 ^b	9,68±0,09 ^a	10,9±1,4 ^b	10,7±0,5 ^b	12,4±0,8 ^c
Treonina	7,30±0,08 ^a	7,06±0,15 ^a	7,9±1,1 ^a	8,0±0,7 ^a	9,7±0,9 ^b
Alanina	6,43±0,00 ^a	6,4±0,3 ^a	8,5±1,2 ^b	7,3±0,3 ^{ab}	9,4±0,6 ^c
Prolina	6,35±0,07 ^a	6,09±0,09 ^a	8,2±0,7 ^b	7,0±0,5 ^a	8,7±0,5 ^b
Cisteína	2,98±0,16 ^a	2,2±0,6 ^a	2,5±0,3 ^a	2,4±0,3 ^a	4,39±0,03 ^b
Tirosina	4,37±0,12 ^a	4,14±0,04 ^a	4,57±0,09 ^a	4,5±0,9 ^a	6,0±0,4 ^b
Valina	9,45±0,07 ^{ab}	8,85±0,08 ^a	10,6±0,8 ^b	10,3±0,7 ^b	13,0±0,7 ^c
Metionina	0,68±0,01 ^a	0,5±0,5 ^a	0,8±0,2 ^a	0,46±0,11 ^a	0,66±0,03 ^a
Lisina	13,38±0,01 ^a	13,0±0,5 ^a	16,4±1,3 ^b	14,0±0,8 ^{ab}	14,0±1,1 ^{ab}
Isoleucina	7,75±0,02 ^a	7,5±0,4 ^a	9,0±1,1 ^b	8,3±1,2 ^{ab}	10,6±0,6 ^c
Leucina	14,36±0,2 ^{ab}	13,43±0,5 ^a	16,0±1,8 ^b	15,7±0,1 ^b	18,2±1,2 ^c
Fenilalanina	10,51±0,14 ^a	9,7±0,8 ^a	11,6±1,4 ^b	11,4±0,8 ^b	12,7±1,1 ^c
Triptófano	2,78±0,12 ^a	3,78±0,01 ^b	3,31±0,01 ^b	2,8±0,3 ^a	2,87±0,04 ^a
EAA	72,6±1,2 ^a	73,0±3,1 ^a	81,9±8,2 ^{ab}	79,7±7,7 ^{ab}	89,1±5,8 ^b
NEAA	112,2±1,5 ^{ab}	103,7±3,1 ^a	121,5±13,0 ^{bc}	117,0±9,7 ^b	132,2±9,8 ^c
EAA/NEAA ratio	0,65±0,02 ^a	0,70±0,05 ^a	0,67±0,14 ^a	0,68±0,12 ^a	0,67±0,10 ^a

Los resultados representan la media de tres repeticiones. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre las judías ($p < 0,05$). Aminoácidos esenciales (EAA), Aminoácidos no esenciales (NEAA)

Como se puede apreciar en la Tabla 2, la fermentación de las judías produjo un aumento significativo tanto en la cantidad de EAA, como en la de NEAA, por lo que puede decirse que este tratamiento mejora el perfil nutricional de las judías significativamente. Dentro de los aminoácidos que más se ven incrementados por la fermentación (de un 30 a un 50%), son la treonina, la leucina y la valina, aminoácidos esenciales, y la alanina, prolina, cisteína y tirosina de los catalogados no esenciales. Específicamente la leucina, que resulta crucial para la producción

de proteínas para el cuerpo humano, y la valina, importante para mantener la salud muscular, experimentaron un aumento del 26,5% y del 38% respectivamente tras la fermentación.

El remojo tuvo un impacto mínimo en el cambio de los niveles de aminoácidos en comparación con las judías de Herradura crudas. Estos resultados son coherentes y se alinean con los estudios realizados en otras legumbres (Espinosa-Páez et al., 2017; Muñoz-Pina et al., 2024).

3.3. Estudio de la influencia de la fermentación en la estructura secundaria de las proteínas mediante FTIR

La calidad de las proteínas depende de su estructura secundaria debido a que esta estructura determina cómo se pliegan y configuran las proteínas, lo cual influye en su funcionalidad y estabilidad. Esta estructura afecta a la capacidad de las proteínas para interactuar con otras moléculas, a su resistencia a la desnaturalización y su digestibilidad. Por lo tanto, modificaciones en la estructura secundaria pueden alterar la eficacia de las proteínas en procesos biológicos y su valor nutricional. Para examinar estas estructuras en las proteínas se utilizó la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) (Liu et al., 2017).

Como se muestra en la Figura 1, la judía de herradura presentaba predominante estructura láminas β ó lámina plegada y en menor proporción estructura β -A y giros β . Las cantidades de las estructuras hélices α y A1 son mínimas. Como se puede corroborar con otros estudios (Liu et al., 2017), las judías son ricas en estructuras de láminas β debido a la presencia de proteínas como las vicilinas y las leguminas, que son comunes en las leguminosas. El procesado de las judías alteró la estructura de la proteína. El remojo, redujo la cantidad de estructura láminas β mientras que aumentó la estructura giros β significativamente. Por otro lado, la esterilización en autoclave produjo el aumento de las estructuras giros β y hélices α en un 310% y un 600% y la reducción de la estructura láminas β en un 39%. Finalmente, el proceso de fermentado aumentó la presencia de estructura A1 y giros β en un 888% y un 220%, mientras que redujo la presencia de láminas β en un 43%. En términos de nutrición, la calidad de las proteínas puede estar relacionada con su digestibilidad y la bioaccesibilidad de sus aminoácidos. Las proteínas con estructuras más compactas, como aquellas con muchas láminas β , podrían ser más difíciles de digerir que aquellas con más giros β y regiones desordenadas. Por lo que, teniendo en cuenta estos datos, la fermentación podría mejorar la calidad de las proteínas aumentando la bioaccesibilidad y digestibilidad (Carbonaro et al., 2012).

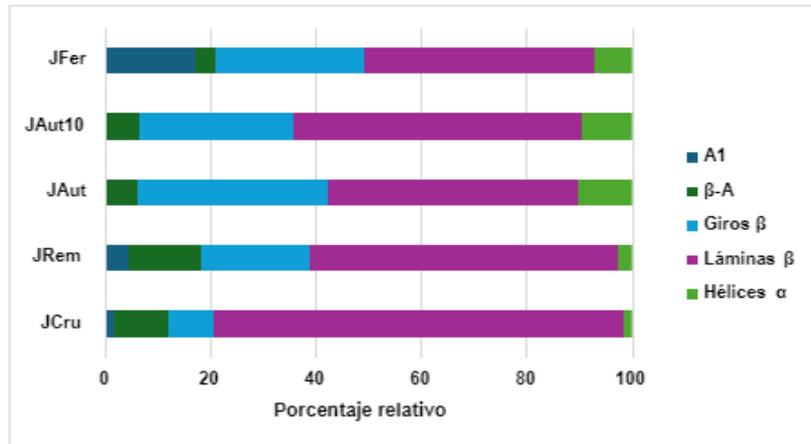


Figura 1. Análisis por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier: Proporción relativa de la estructura secundaria de las proteínas aisladas de las judías.

3.4. Efecto de la fermentación sobre la digestibilidad de los carbohidratos

Tras ver los cambios producidos por la fermentación, se procedió a estudiar su efecto sobre la digestibilidad de los macro y micronutrientes. A modo de control se analizó también la muestra autoclavada debido a que es el procesado que más se asemeja a la cocción típica de las legumbres.

Tal y como se puede apreciar en la Figura 2, el grado de glucólisis de las muestras autoclavadas fue del 60%, mientras que, en las muestras fermentadas, el grado ascendió significativamente hasta el 80%. Por lo tanto, la fermentación incrementa la digestibilidad debido a la actividad de los microorganismos, que metabolizan los carbohidratos presentes en las legumbres descomponiendo los azúcares complejos en compuestos más simples, como glucosa (Sharma et al., 2020).

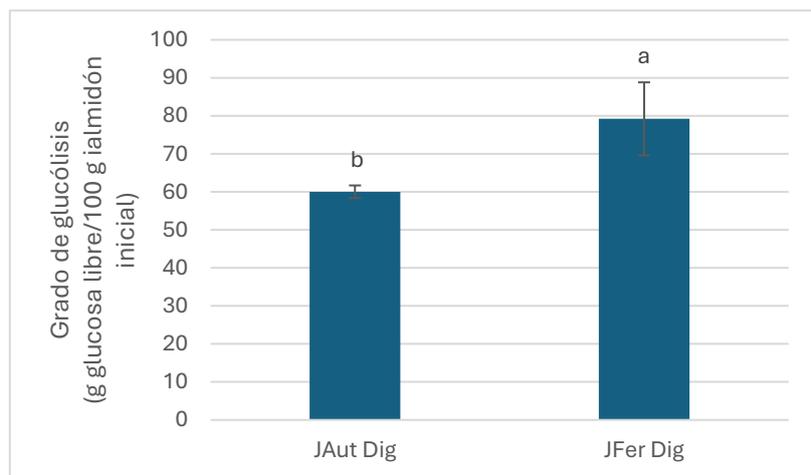


Figura 2. Grado de glucólisis (expresado en g de glucosa libre /100 g de almidón inicial) de la fracción bioaccesible en la digestión intestinal de judías de herradura autoclavadas (JAut) y fermentadas (JFer). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre los modelos de digestión a un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$).

3.5. Efecto de la fermentación sobre la digestibilidad de las proteínas

Para medir la digestibilidad de las proteínas en las muestras de judía de herradura autoclavadas y fermentadas digeridas (JAut Dig y JFer Dig respectivamente), se utilizó la prueba de proteínas solubles en TCA.

Como se puede apreciar en la Figura 3, las muestras autoclavadas dieron una tasa de digestibilidad del 80% aproximadamente, mientras que las judías fermentadas dieron una tasa de digestibilidad del casi 90%.

Teniendo esto en cuenta, la fermentación aumentó significativamente la digestibilidad de proteína. Este hecho se puede deber a varias razones. Por un lado, los microorganismos involucrados en el proceso producen enzimas proteolíticas. Estas enzimas, como las proteasas, descomponen las proteínas en péptidos más pequeños y aminoácidos realizando una hidrólisis previa de la proteína y por tanto mejorando la tasa de digestibilidad final. Por otro lado, el aumento de las estructuras secundarias β -giro y la reducción de las estructuras β -lámina, explicado en el apartado 3.3, pueden mejorar la accesibilidad de las enzimas digestivas mejorando por tanto la digestión de las proteínas (Sánchez-García et al., 2023; Shi et al., 2024).

No obstante, estos resultados dependen significativamente del tipo de sustrato utilizado, ya que se han identificado patrones distintos en otras leguminosas, como las habas (Muñoz-Pina et al., 2024).

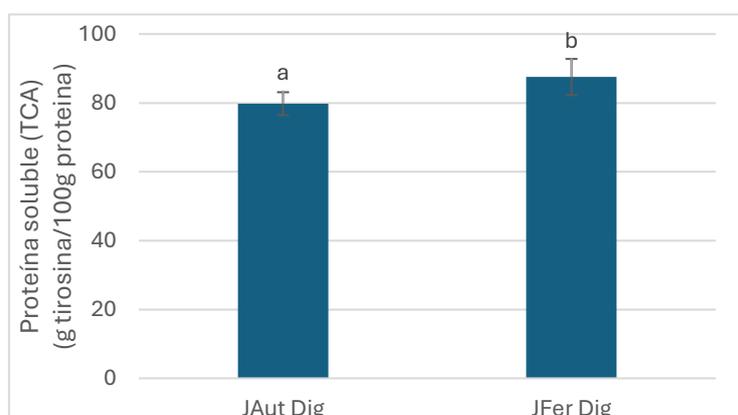


Figura 3. Proteína soluble en TCA de la fracción bioaccesible en la digestión intestinal de judías de herradura esterilizadas en autoclave (JAut) y fermentadas (JFer). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre los modelos de digestión a un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$).

3.6. Bioaccesibilidad de componentes minoritarios y capacidad antioxidante

La Tabla 3 presenta los resultados del contenido total de fenoles (TPC), los cambios en la actividad antioxidante y los cambios en la cantidad de antinutrientes en muestras autoclavadas y fermentadas de judía de herradura (JAut y JFer respectivamente) antes y después de la digestión *in-vitro*.

Como se puede apreciar, tras la digestión, se produjo un aumento significativo de los compuestos fenólicos totales tanto para las muestras tratadas en autoclave, como para las fermentadas. Esto puede ser debido a la liberación de compuestos fenólicos previamente no accesibles que estaban ligados a la fibra u otras estructuras en la muestra sin digerir, o a la transformación de compuestos fenólicos conjugados en formas libres (Bouayed & Bohn, 2010; Tagliazucchi et al., 2010).

En cuanto a la actividad antioxidante, las judías autoclavadas digeridas mostraron una mayor actividad antioxidante en las pruebas ABTS, DPPH y FRAP. Sin embargo, las judías de herradura fermentadas digeridas presentaron una menor actividad antioxidante con diferencias significativas en comparación con las anteriores. Esto se alinea con investigaciones previas que observaron una actividad antioxidante similar en lentejas (Sánchez-García et al., 2023) y habas (Muñoz-Pina et al., 2024) fermentadas con *Pleurotus Ostreatus*.

Las diferencias en la actividad antioxidante pueden atribuirse a variaciones en la digestión de las proteínas, a la liberación de aminoácidos y a la hidrólisis parcial de los grupos hidroxilo fenólicos durante la digestión. Por lo tanto, el análisis de los aminoácidos libres en la muestra fermentada digerida podría proporcionar una mejor interpretación de los resultados. (M. García et al., 2021)

Respecto al análisis de antinutrientes, se puede apreciar que tanto la fermentación de las judías de herradura como la digestión de estas reduce la cantidad de fitatos. Por otro lado, la digestión elimina por completo la presencia de taninos en la fracción bioaccesible.

Tabla 3. Contenido fenólico total, capacidad antioxidante (DPPH, FRAP y ABTS) y antinutrientes (fitatos y taninos) en la fracción bioaccesible del resultado de la digestión in-vitro de judías de herradura autoclavadas (JAut) y fermentadas (JFer) y en las correspondientes judías sin digerir.

Muestra		TPC (mg GAE/ g b.s.)	ABTS (mg TE/ g b.s.)	FRAP (mg TE/ g b.s.)	DPPH (mg TE/ g b.s.)	Fitatos (mg ácido fítico/ g b.s.)	Taninos (mg CAE/ g b.s.)
JAut	Digerida	13,9±4,2 ^b	34,7±2,2 ^b	5,94±0,13 ^d	4,6±0,9 ^b	5,06±0,15 ^b	-
	No digerida	1,26±0,14 ^a	6,4±0,7 ^a	2,9±0,2 ^b	1,1±0,2 ^a	4,0±0,3 ^b	0,43±0,10 ^a
JFer	Digerida	12,3±0,2 ^b	5,6±2,0 ^a	3,9±0,2 ^c	1,1±0,3 ^a	0,5±0,3 ^a	-
	No digerida	1,50±0,13 ^a	4,7±0,4 ^a	1,6±0,2 ^a	1,1±0,2 ^a	0,4±1,5 ^a	0,45±0,13 ^a

Los datos mostrados son valores medios de tres repeticiones. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre las judías a un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$).

3.7. Estudio del efecto de la fermentación en la actividad inhibitoria de ECA

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II, un potente vasoconstrictor que aumenta la

presión arterial. Además, la angiotensina II estimula la liberación de aldosterona, promoviendo la reabsorción de sodio y agua en los riñones, lo que también contribuye a elevar la presión arterial. Teniendo esto en cuenta, los inhibidores de la ECA son fundamentales porque reducen la producción de angiotensina II, lo que resulta en una reducción de la hipertensión e insuficiencia cardíaca.

La Figura 4 ilustra los niveles de inhibición de la ECA de la judía de herradura en los distintos tratamientos aplicados (color negro) y los niveles de inhibición de la misma enzima en la fracción bioaccesible de las muestras esterilizadas en autoclave y fermentadas tras la digestión *in vitro* (color naranja).

Como se puede apreciar, el valor de inhibición de ECA en muestras sin digerir es significativamente mayor cuando se aplica un tratamiento de fermentación. El valor alcanza el 44% frente al 10-15% en los demás tratamientos. Lo mismo ocurre en la fracción bioaccesible de las muestras tras la digestión. El valor de inhibición obtenido con la fermentación es del 66%, mientras que, con el autoclavado es del 48%.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio de Muñoz-Pina et al., 2024, analizando habas fermentadas con el mismo hongo. La fermentación libera bioactivos, como péptidos específicos, que tienen una mayor capacidad para inhibir la enzima convertidora de angiotensina. Estos péptidos inhibidores se generan debido a la actividad proteolítica de las enzimas producidas por los hongos, lo que potencialmente mejora la función antihipertensiva de las legumbres fermentadas.

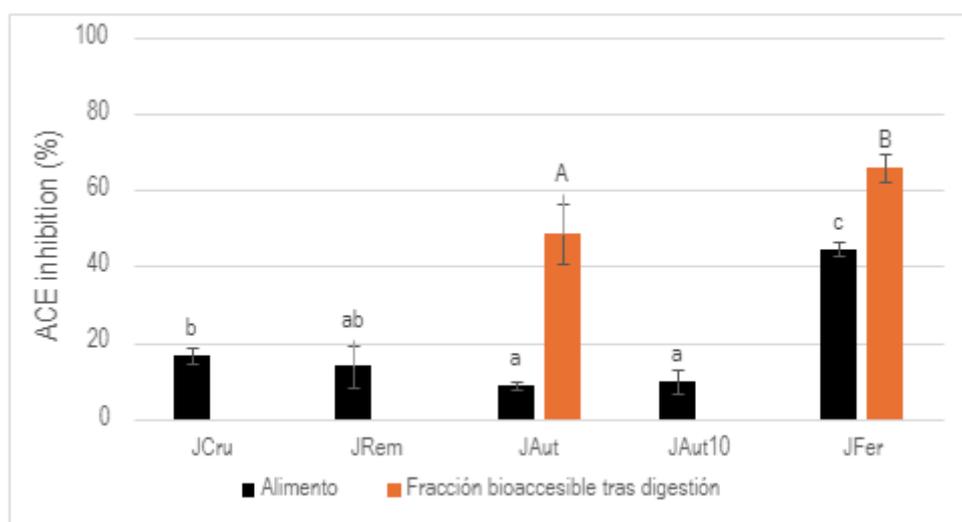


Figura 4. Actividad inhibidora de la ECA (%) de judías de herradura sin digerir crudas (JCru), remojadas (Jrem), autoclavadas (JAut), incubadas en autoclave durante 10 días (Jaut10) y fermentadas (JFerm) y de JAut y JFer tras digestión *in-vitro*. Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre las judías sin digerir ($p < 0,05$). Las letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre las muestras tras la digestión ($p < 0,05$).

4. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este estudio puede afirmarse que la fermentación en estado sólido de las judías de herradura (*Phaseolus vulgaris* L.) con *Pleurotus ostreatus* es un proceso biotecnológico prometedor para mejorar su perfil nutricional y funcional. A través de la fermentación, se logró una reducción significativa de los factores antinutricionales presentes en las judías, como el contenido de ácido fítico, que se asocia comúnmente con la inhibición de la absorción de minerales esenciales. Además, el proceso de fermentación no solo mantuvo, sino que mejoró el contenido proteico de las judías, haciéndolas una fuente aún más valiosa de proteínas vegetales con un contenido mayor en aminoácidos esenciales como la leucina y la valina.

Otro aspecto destacado es la mejora en la digestibilidad de las judías fermentadas, lo cual sugiere que el producto final es más accesible para su absorción y utilización por el organismo. Este hecho, sumado a la reducción en los niveles de carbohidratos y lípidos, respalda el potencial de las judías fermentadas como ingrediente para el desarrollo de snacks saludables, que podrían ayudar a combatir el sobrepeso y la obesidad infantil al poder disponer de snacks alternativos más nutritivos y saciantes.

Por otro lado, la fermentación la judía de herradura, potencia la inhibición de la ECA de manera significativa, aspecto clave para reducir la hipertensión y mejorar la función cardíaca, de manera que también resulta de interés para colectivos con estas afecciones..

En conclusión, la fermentación con *Pleurotus ostreatus* no solo optimiza las propiedades nutricionales de las judías de herradura, sino que también permite su uso como ingrediente para el desarrollo de productos alimentarios más sostenibles y alineados con las necesidades de una dieta moderna y saludable. Estos resultados abren la puerta a futuras investigaciones centradas en la optimización del proceso de fermentación y la exploración de su aplicabilidad en otras legumbres y matrices alimentarias.

5. REFERENCIAS

- AOAC. (2000). Official methods of analysis of AOAC international. Association of Official Analytical Chemists International, USA.
- Aranibar, C., Pigni, N. B., Martinez, M., Aguirre, A., Ribotta, P., Wunderlin, D., & Borneo, R. (2018). Utilization of a partially-deoiled chia flour to improve the nutritional and antioxidant properties of wheat pasta. *LWT*, *89*, 381–387.
- Armellini, R., Peinado, I., Asensio-Grau, A., Pittia, P., Scampicchio, M., Heredia, A., & Andres, A. (2019). In vitro starch digestibility and fate of crocins in pasta enriched with saffron extract. *Food Chemistry*, *283*, 155–163.

- Asensio-Grau, A., Calvo-Lerma, J., Heredia, A., & Andrés, A. (2020). Enhancing the nutritional profile and digestibility of lentil flour by solid state fermentation with *Pleurotus ostreatus*. *Food & Function*, 11(9), 7905–7912.
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228–237.
- Caprioli, G., Nzekoue, F. K., Giusti, F., Vittori, S., & Sagratini, G. (2018). Optimization of an extraction method for the simultaneous quantification of sixteen polyphenols in thirty-one pulse samples by using HPLC-MS/MS dynamic-MRM triple quadrupole. *Food Chemistry*, 266, 490–497.
- Carbonaro, M., Maselli, P., & Nucara, A. (2012). Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study. *Amino Acids*, 43(2), 911–921.
- Downey, M. O., & Hanlin, R. L. (2016). Comparison of ethanol and acetone mixtures for extraction of condensed tannin from grape skin. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31(2).
- Espinosa-Páez, E., Alanis-Guzmán, M., Hernández-Luna, C., Báez-González, J., Amaya-Guerra, C., & Andrés-Grau, A. (2017). Increasing Antioxidant Activity and Protein Digestibility in *Phaseolus vulgaris* and *Avena sativa* by Fermentation with the *Pleurotus ostreatus* Fungus. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(12), 2275.
- Granito, M., Frias, J., Doblado, R., Guerra, M., Champ, M., & Vidal-Valverde, C. (2002). Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation. *European Food Research and Technology*, 214(3), 226–231.
- Hernández-Olivas, E., Muñoz-Pina, S., Andrés, A., & Heredia, A. (2021). Age-related gastrointestinal alterations of legumes and cereal grains digestibility. *Food Bioscience*, 41(101027), 101027. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101027>
- Lavie, C. J., Ozemek, C., Carbone, S., Katzmarzyk, P. T., & Blair, S. N. (2019). Sedentary behavior, exercise, and cardiovascular health. *Circulation Research*, 124(5), 799–815.
- Liu, Y., Wu, X., Hou, W., Li, P., Sha, W., & Tian, Y. (2017). Structure and function of seed storage proteins in faba bean (*Vicia faba* L.). *3 Biotech*, 7(1). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0691-z>
- Mattes, R. D. (2018). Snacking: A cause for concern. *Physiology & Behavior*, 193, 279–283.
- OMS (2024). *Obesidad y sobrepeso*. Retrieved August 21, 2024, from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Proserpio, C., Bresciani, A., Marti, A., & Pagliarini, E. (2020). Legume flour or bran: Sustainable, fiber-rich ingredients for extruded snacks? *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(11), 1680.
- Sánchez-García, J., Muñoz-Pina, S., García-Hernández, J., Tárrega, A., Heredia, A., & Andrés, A. (2023). In vitro digestion assessment (standard vs. Older adult model) on antioxidant properties and mineral bioaccessibility of fermented dried lentils and quinoa. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(21), 7298.
- Sharma, R., Garg, P., Kumar, P., Bhatia, S. K., & Kulshrestha, S. (2020). Microbial fermentation and its role in quality improvement of fermented foods. *Fermentation*, 6(4), 106.
- Shi, D., Stone, A. K., Jafarian, Z., Liu, E., Xu, C., Bhagwat, A., Lu, Y., Gao, P., Polley, B., Bhowmik, P., Rajagopalan, N., Tanaka, T., Korber, D. R., & Nickerson, M. T. (2024). Submerged fermentation of lentil protein isolate and its impact on protein functionality, nutrition, and volatile profiles. *Journal of Food Science*, 89(6), 3412–3429.

Shrestha, S., van 't Hag, L., Haritos, V., & Dhital, S. (2023). Comparative study on molecular and higher-order structures of legume seed protein isolates: Lentil, mungbean and yellow pea. *Food Chemistry*, 411(135464), 135464.

Smith, J. D., Fu, E., & Kobayashi, M. A. (2020). Prevention and management of childhood obesity and its psychological and health comorbidities. *Annual Review of Clinical Psychology*, 16(1), 351–378.

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599–606.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 669–675.

Ma, X., Wang, W., Wang, D., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2016). Degradation kinetics and structural characteristics of pectin under simultaneous sonochemical-enzymatic functions. *Carbohydrate Polymers*, 154, 176–185.

Marín-Guerrero, A. C., Gutiérrez-Fisac, J. L., Guallar-Castillón, P., Banegas, J. R., & Rodríguez-Artalejo, F. (2008). Eating behaviours and obesity in the adult population of Spain. *The British Journal of Nutrition*, 100(5), 1142–1148.

Millar, K. A., Gallagher, E., Burke, R., McCarthy, S., & Barry-Ryan, C. (2019). Proximate composition and anti-nutritional factors of fava-bean (*Vicia faba*), green-pea and yellow-pea (*Pisum sativum*) flour. *Journal of Food Composition and Analysis: An Official Publication of the United Nations University, International Network of Food Data Systems*, 82(103233), 103233.

Minekus, M., Almingier, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Maclerzanka, A., MacKie, A., Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124.

(Xu & Chang, 2008)
Xu, B., & Chang, S. K. C. (2008). Effect of soaking, boiling, and steaming on total phenolic content and antioxidant activities of cool season food legumes. *Food Chemistry*, 110(1), 1–13.

Zamora, H. D., Silva, T. A. L., Varão, L. H. R., Baffi, M. A., & Pasquini, D. (2021). Simultaneous production of cellulases, hemicellulases, and reducing sugars by *Pleurotus ostreatus* growth in one-pot solid state fermentation using *Alstroemeria* sp. waste. *Biomass Conversion and Biorefinery*.