

Impacto de la Fermentación en Estado Sólido Sobre el Perfil de Compuestos Fenólicos y Propiedades Antioxidante e Hipoglucemiante de Frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L.)

M. Rivas-Medina, L. León-López, C. Reyes-Moreno, J. Milán-Carrillo, E. Cuevas-Rodríguez, N.Y. Salazar-Salas, J. Perales-Sánchez, R. Gutiérrez-Dorado.

1 Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB), Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS). 2 Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, FCQB-UAS. Malenny.rivas@gmail.com

RESUMEN:

El frijol es un alimento funcional por su aporte en compuestos bioactivos (principalmente compuestos fenólicos) con beneficios a la salud. La fermentación en estado sólido (FES) es un bioproceso que aumenta la disponibilidad de compuestos bioactivos con potencial nutraceutico. El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios en el perfil de compuestos fenólicos, actividad antioxidante (AAox) y potencial hipoglucemiante de extractos etanólicos de frijol común cv Azufrado Higuera por efecto de la FES. La AAox y el potencial hipoglucemiante del frijol común incrementaron significativamente debido al bioprocésamiento por FES (+271% ABTS, +148% DPPH, +119% ORAC, y +39.6% inhibición de α -amilasa). En el extracto de frijol crudo los compuestos fenólicos identificados fueron derivados de los ácidos aldarico, ferúlico y sinápico, dímeros de procianidinas, y flavonoles derivados de isorhamnetina y kaempferol. El extracto de frijol fermentado presentó un mayor número de compuestos fenólicos identificados que el extracto de frijol crudo, destacando la aparición de nuevos compuestos, y con ello un perfil fenólico más variado tras la FES. En conclusión, se puede decir que la FES es un bioproceso efectivo para incrementar el contenido de compuestos fenólicos responsables del aumento de la actividad antioxidante e hipoglucemiante en frijol común.

Palabras clave: Actividades antioxidante/hipoglucemiante, compuestos fenólicos, fermentación en estado sólido, frijol común.

ABSTRACT:

Bean is a functional food for its contribution in bioactive compounds (mainly phenolic compounds) with health benefits. Solid state fermentation (FES) is a bioprocess that increases the availability of bioactive compounds with nutraceutical potential. The objective of this work was to study the changes in the profile of phenolic compounds, antioxidant activity (AAox) and hypoglycemic potential of ethanolic extracts of common bean cv Azufrado Higuera by effect of FES. AAox and hypoglycemic potential of common bean increased significantly due to FES bioprocessing (+ 271% ABTS, + 148% DPPH, + 119% ORAC, and + 39.6% inhibition of α -amylase). In the extract of raw bean the identified phenolic compounds were derived from aldaric, ferulic and synapic acids, procyanidins dimers, and flavonols derived from isorhamnetin and kaempferol. Fermented bean extract showed a higher number of identified phenolic compounds than the raw bean extract, highlighting the appearance of new compounds, and with it a more varied phenolic profile after FES. In conclusion, the FES is an effective bioprocess to increase the content of phenolic compounds responsible for the increase of antioxidant and hypoglycemic activity in common bean.

Keywords: Antioxidant / hypoglycemic activities, Common bean, phenolic compounds, solid state fermentation.

INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo es una condición donde existe un desequilibrio entre las moléculas oxidantes y las antioxidantes del organismo, con balance favorable en las primeras. Este desbalance oxidativo está relacionado con el daño a macromoléculas (lípidos, proteínas, ADN) lo que conlleva a la aparición y progresión de enfermedades crónicas (Ames y col 1993). La diabetes mellitus es un desorden metabólico que surge por una falla del organismo en producir suficiente insulina y/o el desarrollo de resistencia a la insulina, resultando con altos niveles de glucosa en sangre; el mantenimiento de la misma provoca complicaciones macro y micro vasculares (Varghese y col 2013). Es por esto que el tratamiento de diabetes tiene como objetivo la disminución de hiperglucemia (Aguilar-Salinas y col 2003). Uno de los tratamientos de la diabetes son fármacos cuyo mecanismo de acción es inhibir enzimas encargadas de la hidrólisis del almidón (α -amilasa y α -glucosidasa), y con esto disminuir la hiperglucemia postprandial, sin embargo estos producen complicaciones gastrointestinales como flatulencia, dolor abdominal, entre otros (Benavides Moraz y col 2000). En los últimos años, han incrementado las investigaciones en identificar potentes inhibidores enzimáticos de origen natural con menos efectos secundarios que los fármacos comerciales (Habtemariam 2011). En la literatura, se ha reportado que las leguminosas contienen compuestos bioactivos capaces de inhibir a las enzimas que hidrolizan el almidón (El Sohaimy 2012). El frijol común (*Phaseolus Vulgaris* L) es la leguminosa más consumida en el mundo, es reconocida por ser la principal fuente de proteínas en países de América Latina. Además de su aporte en proteína, el frijol es fuente de carbohidratos complejos, fibra, vitaminas y minerales (de Almeida Costa y col 2006). Recientemente se le considera como alimento funcional por su contenido en compuestos bioactivos, principalmente fenólicos, a los que se le atribuye potencial benéfico en la salud (Maldonado y col 2015). Existe el interés en la búsqueda de procesamientos que mejoren las características nutraceuticas de alimentos funcionales como el frijol. La fermentación en estado sólido (FES) es un bioproceso que consiste en el crecimiento de microorganismos especialmente hongos en un sustrato sólido con la presencia de pequeñas cantidades de agua superficial, con la finalidad de mejorar características nutricionales y de sabor (Mitchell y col 2002). Se ha reportado que la aplicación de FES en leguminosas como el frijol mejora la biodisponibilidad de nutrimentos e incrementa su potencial nutraceutico, como consecuencia del aumento en compuestos fenólicos (Reyes-Bastidas y col 2010). Recientemente se ha aplicado esta tecnología en frijol común empleando el hongo *Rhizopus oligosporus*, observándose un aumento de la biodisponibilidad de nutrimentos y mejora en actividad antioxidante y el contenido de fenólicos totales (Guzmán-Uriarte y col, 2013; Rochín-Medina y col, 2015). Sin embargo, no existen reportes acerca del efecto de la fermentación en estado sólido con el hongo *Rhizopus oligosporus* sobre los perfiles de compuestos fenólicos en frijol común, compuestos relacionados con el potencial antioxidante e hipoglucemiante de esta leguminosa. En este sentido, el objetivo de este trabajo de investigación fue estudiar los cambios inducidos por la FES con *R. oligosporus* en el perfil de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y potencial hipoglucemiante de extractos (etanol 80%) de frijol común. La actividad antioxidante de los extractos fue evaluada por los métodos ABTS, DPPH y ORAC, mostrando un incremento significativo ($p < 0.05$) (+119-271%) en el frijol común bioprocesado (FCB) con respecto a los obtenidos a partir de frijol común crudo (FCC) independientemente del método empleado. El índice de inhibición de α -amilasa también fue afectado positivamente por la FES con un incremento significativo ($p < 0.05$) del 39.6%. Adicionalmente, mediante UPLC-DAD-MS se lograron evidenciar cambios importantes en el perfil de compuestos fenólicos por efecto de la FES, principalmente la aparición de 7 compuestos no presentes en el FCC, mismos que podrían estar relacionados con los incrementos observados tanto en actividad antioxidante como hipoglucemiante. Los resultados indican que la FES es una herramienta útil para incrementar el potencial nutraceutico del frijol común.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales. El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L. variedad Azufrado higuera) fue cultivado en la estación experimental del valle de Culiacán del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Sinaloa, México. Los granos fueron cosechados, limpiados y almacenados a 4°C en contenedores ligeramente sellados hasta su uso. La cepa de *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 fue obtenida de la colección americana de cultivo, Manassas, EUA.

Producción de frijol común bioprocesada. Los granos de frijol fueron remojados a 25°C por 4 horas en agua destilada. Los granos fueron drenados y sus testas fueron removidas manualmente. Las cascarillas fueron secadas y molidas para su posterior reincorporación con los cotiledones. Los pasos de remojo y descascarillado fueron utilizados como condiciones pre-tratamiento para el crecimiento y penetración del hongo. Los cotiledones fueron cocidos en una solución de ácido acético (pH 3.0; 90°C/30 min), enfriados (25 °C), inoculados con suspensión de esporas *R. oligosporus* (1 x 10⁶ esporas/mL) y empacadas en bolsas de polietileno perforadas (15 x 15 cm). La FES fue realizada utilizando las condiciones optimizadas por León-murillo y col (2016) para maximizar actividades antioxidante e hipoglucemiante de esta variedad de frijol común, con una temperatura de 33.5 °C y un tiempo de fermentación de 108 horas. Los cotiledones de frijol bioprocesados fueron secados (50°C/8 horas), enfriados (25°C) y molidos. La harina fermentada fue mezclada con sus correspondientes testas molidas, empacadas y mantenidas a 4°C hasta su uso. Para evaluar el efecto de la FES, se preparó harina de frijol común crudo (FCC); los granos enteros fueron molidos y la harina fue empacada y mantenida a 4°C hasta su uso.

Extracción de compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos fueron extraídos según lo reportado por Dewanto y col (2002). Se mezclaron 0.5 g de muestra con 10 mL de etanol al 80% durante 10 minutos, posteriormente fueron centrifugados (5000 x g/10min); lo anterior se repitió 2 veces y los sobrenadantes fueron recuperados, concentrados al vacío a 45°C y almacenados a -20 °C hasta su evaluación.

Actividad antioxidante. La actividad antioxidante de los extractos etanólicos fue determinada por las metodologías ABTS, DPPH y ORAC siguiendo las metodologías descritas por Re y col (1999), Brand y col (1995) y Ou y col (2001), respectivamente. Los resultados fueron expresados como μ moles ET/100 g de muestra en base seca. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Actividad hipoglucemiante. La actividad hipoglucemiante de los extractos etanólicos fue evaluada siguiendo la metodología descrita por McCue y col (2005). Los resultados se reportaron como índice de inhibición de α -amilasa.

Perfil de compuestos fenólicos. Para determinar el perfil de compuestos fenólicos se analizaron 10 μ L del extracto etanólico con un equipo de UPLC-DAD-MS ACCELA (Thermo Fisher Scientific, Inc, Whalman, USA). La separación se realizó en una columna FORTIS C18 (50 x 2.1 mm) (Fortis Technologies LTD., Cheshire, Inglaterra). La fase móvil consistió de agua-ácido fórmico al 1 % (A) y acetonitrilo (B) inyectándose al HPLC con una velocidad de flujo de 0.2 mL/min. El tiempo total de corrida fue de 50 minutos. La detección se realizó a 280, 320 y 350 nm. La identificación de compuestos fenólicos en la muestra se realizó por comparación de los tiempos de retención y espectros de los picos cromatográficos con los de estándares comerciales (ác. Gálico, ác. Siríngico, catequina, kaempferol, ác. Ferúlico) y por espectrometría de masas.

Análisis estadístico. Los resultados de las actividades antioxidante e hipoglucemiante fueron analizados por medio de un análisis unidireccional de varianza (ANOVA), seguido por comparación de medias aplicando la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de significancia de 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la FES sobre actividad antioxidante e inhibición de α -amilasa. En general, la actividad antioxidante del frijol común incremento con la FES (**Tabla I**). La actividad antioxidante evaluada por ABTS incremento en 271%, después de la fermentación. Los métodos de DPPH y ORAC mostraron tendencia similar con 148% y 119% de incremento, respectivamente. La actividad hipoglucemiante evaluada como índice de inhibición de α -amilasa incremento en 39.6% después de la fermentación (**Tabla I**).

Actividad	FCC ¹	FCB ²
Antioxidante (μ moles ET/100 g muestra, bs)		
ABTS	1,484 ^B	5,505 ^A
ORAC	4,766 ^B	10,447 ^A
DPPH	373 ^B	928 ^A
Hipoglucemiante		
Índice de inhibición α-amilasa	2.55 ^B	3.56 ^A

Los datos se expresan como el promedio de 3 réplicas. Medias con diferente letra (^{A-B}) en el mismo renglón son diferentes (Duncan, $p < 0.05$). ¹ Frijol común crudo. ² Frijol común bioprocesado.

Efecto de la FES sobre el perfil de compuestos fenólicos. La detección UV proporcionó una visión completa de los principales compuestos fenólicos presentes en los extractos etanólicos en estudio. La técnica de UPLC-DAD-MS proporcionó información estructural de los compuestos presentes. El análisis de espectros MS registradas para cada pico, junto con datos de MS², UV y tiempos de retención llevaron a la identificación de diversos compuestos en los extractos analizados. En la **Tabla II** se muestran los compuestos identificados en el extracto obtenido a partir de FCC, mientras que en la **Tabla III** se muestran los compuestos identificados en el extracto del FCB. Se observan diferencias cualitativas entre el perfil de compuestos fenólicos de ambos extractos (**Tabla II y III**). En el extracto de FCC los compuestos identificados fueron derivados de los ácidos aldarico, ferúlico y sinápico, los cuales presentaron λ máx. en el espectro UV e iones moleculares correspondientes a estos compuestos; además de dímeros de procianidinas, y flavonoles derivados de isorhamnetina y kaempferol (**Tabla II**). Por su parte, el extracto de FCB presentó cambios importantes con respecto al extracto de FCC, destacando la aparición de nuevos compuestos, lo que indica un perfil más variado tras la FES (**Tabla III**).

Compuesto	λ máx (nm)	Ión Molecular [M-H] ⁺ (m/z)	Fragmentación MS ² (m/z)
Aromadendrina 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosido	245, 312	451	289, 271, 261, 154, 152
Catequina conjugada	245, 325		205, 261
Ác. Ferúlico conjugado	245, 325	386	209, 191, 147, 173, 129
trans-feruloilaldáricoaldehído	246, 327	403	386, 194
Ác. Sinapoilaldárico	245, 325	415	223, 209, 191
Ác. Sinápico- <i>O</i> -hexósido	246, 328	386	225, 210, 192, 181
Derivado de Ác. p-cumárico	245, 327	417	165, 120, 101
Isorhamnetina- <i>O</i> -acetilhexosido	245, 323	520	203, 315
Kaempferol-3- <i>O</i> -xiloglucósido	265, 350	581	465, 449, 287
Kaempferol- <i>O</i> -glucósido	265, 345	449	287
kaempferol-3- <i>O</i> -(6''-malonil)- β -D-glucopiranosido	265, 346	535	489, 227, 284
Kaempferol acetil- <i>O</i> -dihexósido	245, 343	491	287
Kaempferol	246, 365	287	271
Procianidina conjugada	280	1085	1085, 865, 577, 289
Procianidina conjugada	282	1069	883, 779

Tabla III. Compuestos fenólicos identificados en extractos etanólicos de frijol común bioprocesado (FCB) por FES.

Compuesto	UV máx (nm)	Ión Molecular [M-H] ⁺ (m/z)	Fragmentación MS2 (m/z)
Ác. Sinápico	256	387	226, 210, 138
Ác. Gálico	240, 260	171	171, 127
Ác. Gálico hidratado	240, 260	189	189, 127, 99
Ác. Gálico-O-hexósido	235, 255	333	333, 315, 171, 170, 127
Ác. Vanilílico 4-O-β-D-glucopiranosido	240, 298	331	169, 124
Ác. Vanilílico hexósido pentosido		463	419, 287, 125
Ác. Cafeoilquinico 1	267, 290	355	255, 192, 181, 136
Ác. Cafeoilquinico 2	280	355	255, 192, 136
Catequina	240, 278	289	247, 223, 205, 153, 125, 111
No identificado	240, 278	217	245
Ác. Ferúlico-O-hexósido	280, 311	357	195, 151
Ác. Dihidroxibenzoico malonil hexósido	230, 280	403	359, 317, 155, 154, 111, 110
Aromadendrina	290, 310	289	261, 179, 153, 127
Biocanina A 7-O-β-D-glucopiranosido	250, 327	447	285, 270, 250, 219, 234
Pratenseina 7-O-β-D-glucopiranosido	244, 310	463	315, 303, 286, 171, 152, 149, 109
Rutina	266, 341	611	303
Kaempferol 3-O-xiloglucósido	264, 350	303	266, 341
Kaempferol-3-O-glucosido	264, 342	581	287, 465
Kaempferol 3-O-malonil glucósido	265, 346	449	287
Kaempferol-O-acetilhexosido	265, 347	535	287
kaempferol	265, 366	491	287
Isómero de metil-isoflavona	258, 300	285	257, 229

El incremento observado en actividad antioxidante evaluada por distintos métodos, así como el incremento en la actividad hipoglucemiante evaluada como inhibición de α -amilasa puede ser atribuido a la modificación y mejora en el perfil de compuestos fenólicos observado tras la FES. Estas modificaciones pueden ser el resultado de una serie de cambios metabólicos que tienen lugar durante la fermentación de los cotiledones de frijol, principalmente al incremento de la actividad en las enzimas endógenas producidas por el hongo *Rhizopus oligosporus* (Hur y col 2014), como β -glucosidasa, enzima que actúa sobre el enlace glucosídico de compuestos fenólicos glucosilados liberando agliconas, además de esterasas como xiloglucanasa y endoglucanasas que podrían facilitar la extracción de compuestos ligados a la pared celular en los cotiledones (Miszkievicz y col 2004).

En conclusión, se puede decir que la FES es un bioproceso efectivo para incrementar el contenido de compuestos fenólicos responsables del aumento de la actividad antioxidante e hipoglucemiante en frijol común.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguiar, CA., Monroy, OV., Gómez, FJ., Chávez, AG., Esqueda, AL., Cuevas, VM., Rull, JA., Conyer, RT. 2003. Characteristics of Patients With Type 2 Diabetes in México Results from a large population-based nationwide survey. *Diabetes care*, 26(7):2021-2026.
- Ames, BN., Shigenaga, MK., Hagen, TM. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17):7915-7922.
- Benavides, M., Bruscas, M., Mozota, J., Medrano, S. 2000. Los nuevos antidiabéticos orales para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Medicina integral*, 36(09):355-358.
- Brand, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- De Almeida, GE., da Silva, K., Reis, AC. 2006. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food chemistry*, 94(3):327-330.
- Dewanto, V., Wu, X., Liu, R. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4959-4964.
- El Sohaimy, S. 2012. Functional foods and nutraceuticals-modern approach to food science. *World Applied Sciences Journal*, 20(5):691-708.

- Guzmán, ML., Sánchez, LM., Angulo, GY., Cuevas, EO., Gutiérrez, R., Mora, S., Milán, J., Valdez, A., Reyes, C. 2013. Solid state bioconversion for producing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) functional flour with high antioxidant activity and antihypertensive potential. *Food and Nutrition Sciences*, 4(4):480.
- Habtemariam, S., 2011. A-glucosidase inhibitory activity of kaempferol-3-O-rutinoside. *Natural product communications*, 6(2):201-203.
- Hur, S., Lee, S., Kim, Y., Choi, I., Kim, G. 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food chemistry*, 160, 346-356.
- Maldonado, SHG., Gallegos, JAA., de los Ángeles, M., García, GL. 2015. Calidad alimentaria y potencial nutracéutico del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 28(2):159-173.
- Mccue, P., KWON, Y., Shetty, K. 2005. Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotensin i-converting enzyme potential of selected foods. *Journal of Food Biochemistry*, 29(3), 278-294.
- Mitchell, DA., Berovic, N. 2002. Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnology Annual Review*, 8:183-225.
- Miskiewicz, H., Bizukojc, M., Rozwandowicz, A., Bielecki, S. 2003. Physiological properties and enzymatic activities of *Rhizopus oligosporus* in solid state fermentations. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 68(2; PART A), 313-316.
- Ou, B., Hampschl, M., Prior, R. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4619-4626.
- 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), 1231-1237.
- Reyes, M., Reyes, EZ., López, J., Milán, J., Loarca, GF., Reyes, C. 2010. Physicochemical, nutritional and antioxidant properties of tempeh flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food science and technology international*, 16(5):427-434.
- Rochín, JJ., Gutiérrez, R., Sánchez, LM., Milán, J., Cuevas, EO., Mora, S., Valdez, A., Reyes, C. 2015. Enhancement of nutritional properties, and antioxidant and antihypertensive potential of black common bean seeds by optimizing the solid state bioconversion process. *International journal of food sciences and nutrition*, 66(5):498-504.
- Varghese, GK., Bose, LV., Habtemariam, S. 2013. Antidiabetic components of *Cassia alata* leaves: identification through α -glucosidase inhibition studies. *Pharmaceutical biology*, 51(3):345-349.