

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**OBTENCIÓN DE UN INGREDIENTE MULTIFUNCIONAL A PARTIR DE  
LENTEJA MEDIANTE FERMENTACIÓN E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A pH  
CONTROLADO DIRIGIDO AL CONTROL DEL SÍNDROME METABÓLICO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**SARA BAUTISTA EXPÓSITO**

DIRECTORAS

**Dra. CRISTINA MARTÍNEZ VILLALUENGA**

**Dra. ELENA PEÑAS POZO**

**Dra. JUANA FRÍAS AREVALILLO**

**Madrid, 2018**





MINISTERIO  
DE CIENCIA, INNOVACIÓN  
Y UNIVERSIDADES



**CRISTINA MARTÍNEZ VILLALUENGA, CIENTÍFICA TITULAR, ELENA PEÑAS POZO, INVESTIGADORA DISTINGUIDA, Y JUANA FRIAS AREVALILLO, INVESTIGADORA CIENTÍFICA, PERTENECIENTES AL DEPARTAMENTO DE CARACTERIZACIÓN, CALIDAD Y SEGURIDAD DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN (ICTAN) DE LA AGENCIA ESTATAL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC),**

HACEN CONSTAR QUE:

La presente memoria de tesis doctoral titulada **“Obtención de un ingrediente multifuncional a partir de lenteja mediante fermentación e hidrólisis enzimática a pH controlado dirigido al control del Síndrome Metabólico”** ha sido realizada por Dña. Sara Bautista Expósito bajo nuestra dirección para optar al título de doctor por la Universidad Complutense de Madrid, dando nuestra conformidad para que sea presentada y defendida.

Madrid, 16 de octubre de 2018

Dra. Cristina Martínez Villaluenga

Dra. Elena Peñas Pozo

Dra. Juana Frías Arevalillo





Visto Bueno: TUTORA

Dra. Elena Pérez-Urría Carril  
Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología  
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid



---

Los estudios realizados en esta Memoria han sido financiados por el proyecto de investigación AGL2013-43247-R titulado “Producción y validación de nuevos ingredientes multifuncionales en combinación con ejercicio físico para el control del Síndrome Metabólico” concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad (2013-2017) y el proyecto intramural 201670I044 titulado “Validación de nuevos ingredientes multifuncionales de legumbres para el control del Síndrome Metabólico” concedido por la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (2016).

---



**A los grandes pilares: mis padres, mi hermano y mi costilla...**



## **Agradecimientos**

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al soporte técnico y a todas las personas del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) y del Instituto de Química Orgánica General Manuel Lora Tamayo que me han ayudado y facilitado mi estancia predoctoral.

En primer lugar, quisiera agradecer de manera muy especial a mis directoras de Tesis, las Doctoras Juana Frías, Cristina Martínez y Elena Peñas por su enorme contribución a mi formación y desarrollo profesional y por la paciencia, apoyo y confianza depositadas para poder llevar a cabo este trabajo, puesto que sin su ayuda no habría sido posible. Muchísimas gracias por acogerme todo este tiempo, guiarme y aconsejarme, haciéndome crecer tanto profesional como personalmente.

Seguidamente, mis agradecimientos van dirigidos a la Facultad de Ciencias Biológicas de la UCM y en particular a las Doctoras Elena Pérez-Urría Carril por ser mi tutora académica y ofrecerme siempre su ayuda y disponibilidad y María Aránzazu Gómez Garay por ser mi directora del Trabajo de Fin de Grado. Gracias por su gran labor como profesoras y por darme la posibilidad de iniciarme en el mundo de la investigación.

Gracias al Dr. José Manuel Silván por su colaboración e implicación en esta Tesis, por la posibilidad de trabajar codo con codo, de enseñarme las técnicas de cultivo celular y por hacerme más llevaderos los madrugones en el laboratorio de cultivos.

También tengo que agradecer a los compañeros de laboratorio por hacer tan ameno el día a día (Natalia, Patricio, Patricia, Cristian, Marcela, José Antonio...).

Además, tengo que expresar mi más sincera gratitud a la Dra. Blanca Hernández y al Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL-CSIC) por su aceptación y ayuda durante la estancia en su laboratorio.

Agradecer también a todo el personal del Departamento de Biotecnología Bacteriana del ICTAN (Rosario, Blanca, Lauras, Pepe e Inés) por dejarme invadir el laboratorio de vez en cuando, ayudarme siempre que me ha hecho falta y alegrarme el día con vuestras conversaciones.

Así mismo agradecer a la Dra. Montserrat Dueñas de la Universidad de Salamanca su colaboración en la determinación de compuestos fenólicos.

Muchísimas gracias a todas las personas que he conocido en este Instituto durante estos años que me han ayudado y apoyado y que, de una manera u otra han contribuido a que esta Tesis sea posible. Muchas gracias a Laura, Graciela, Sonia Ramos, Nines y Luis entre muchos.

En este punto tengo que agradecer a todos mis amigos tanto de la carrera como de fuera de ella su apoyo e interés en mi trabajo sobre todo con esa frase de “¿Cómo van las lentejas?” que voy a echar tanto de menos. Mil gracias a todos, especialmente a “La Rubia”, Elena, David, Sergio, Andrés, Iván, María, Olga y José Manuel.

No pueden faltar aquí mis mayores agradecimientos a los que realmente han hecho posible este trabajo y que no pueden ser otros que mis abuelos, mi padre que es el culpable de que sea Bióloga, mi madre que me ha transmitido la paciencia, perseverancia y el luchar por lo que uno quiere, mi hermano (y soporte informático además de emocional) y Alberto que me ha enseñado que “si te caes siete veces, te levantas ocho”. Gracias por estar siempre ahí escuchándome, aconsejándome, dándome ánimos y fuerzas para seguir, así como a toda mi familia por su apoyo incondicional. He de mencionar aquí también a Juan Antonio Quirós que siempre me hace ver el mundo con otros ojos. Sin todos ellos no habría llegado donde estoy hoy. Gracias por hacerme la persona que soy, por estar ahí en los buenos momentos y en los que más lo necesitaba. De todo corazón, gracias.

## **Aportaciones científicas**

La presente Memoria ha dado lugar a las siguientes aportaciones científicas:

### ***Publicaciones en revistas indexadas en el Journal Citation Reports (JCR)***

1. **Bautista-Expósito, S.**, Peñas, E., Dueñas, M., Silván, J.M., Frias, J., Martínez-Villaluenga, C. Individual contributions of Savinase and *Lactobacillus plantarum* to lentil functionalization during alkaline pH-controlled fermentation. *Food Chemistry*, 2018, 257: 341-349. Índice de impacto (JCR 2017): 4.946 (posición: 7 de 133, primer decil)
2. **Bautista-Expósito, S.**, Martínez-Villaluenga, C., Dueñas, M., Silván, J.M., Frias, J., Peñas, E. Combination of pH-controlled fermentation in mild acidic conditions and enzymatic hydrolysis by Savinase to improve metabolic health-promoting properties of lentil. *Journal of Functional Foods*, 2018, 48: 9-18. Índice de impacto (JCR 2017): 3.470 (posición: 16 de 133, primer cuartil)
3. **Bautista-Expósito, S.**, Peñas, E., Silván, J.M., Frias, J., Martínez-Villaluenga, C. pH-controlled fermentation in mild alkaline conditions enhances bioactive compounds and functional features of lentil to ameliorate metabolic disturbances. *Food Chemistry*, 2018, 248: 262-271. Índice de impacto (JCR 2017): 4.946 (posición: 7 de 133, primer decil)
4. **Bautista-Expósito, S.**, Peñas, E., Frias, J., Martínez-Villaluenga, C. Pilot-scale produced fermented lentil protects against *t*-BHP-triggered oxidative stress by activation of Nrf2 dependent on SAPK/JNK phosphorylation. *Food Chemistry*, 2019, 274: 750-759. Índice de impacto (JCR 2017): 4.946 (posición: 7 de 133, primer decil)

### ***Contribución a congresos***

1. **Bautista-Expósito, S.**, Peñas, E., Frias, J., Martínez-Villaluenga, C. Production of functional hydrolysates from lentil by pH-controlled fermentation combined with enzymatic treatment. EuroFoodChem XVIII, 2015, Madrid (España).
2. **Bautista-Expósito, S.**, Peñas, E., Silván, J.M., Dueñas, M., Frias, J., Martínez-Villaluenga C. Alkaline fermentation and enzymatic hydrolysis of lentil favors the release of

bioactive compounds with protective effects against oxidative stress. EuroFoodChem XIX, 2017, Budapest (Hungría).

3. **Bautista-Expósito, S.**, Peñas, E., Silván, J.M., Dueñas, M., Frias, J., Martínez-Villaluenga, C. Combination of fermentation and enzymatic hydrolysis enhances the release of lentil bioactive compounds with potential protective effects against the Metabolic Syndrome. EuroFoodChem XIX, 2017, Budapest (Hungría).
4. **Bautista-Expósito, S.**, Peñas, E., Dueñas, M., Frias, J., Martínez-Villaluenga, C. La combinación de la fermentación e hidrólisis enzimática mejora la liberación de compuestos bioactivos en lenteja con efectos protectores frente al Síndrome Metabólico. IX Congreso CyTA-CESIA, 2017, Madrid (España).
5. **Bautista-Expósito, S.**, Peñas, E., Frias, J., Martínez-Villaluenga, C. Fermented lentil activates Nrf2 translocation and catalase expression via phosphorylation of MAPK in RAW264.7 macrophages. XII Congreso Internacional de Nutrición, Alimentación y Dietética, 2018, Madrid (España).
6. **Bautista-Expósito, S.**, Martínez-Villaluenga, C., Peñas, E., Silván, J. M., Dueñas, M., Frias, J. Obtención de un ingrediente multifuncional a partir de lentejas mediante fermentación controlada e hidrólisis enzimática capaz de retrasar el síndrome metabólico (SMET). Jornada Científico-Técnica CeIA3 y VI Jornada AEL Leguminosas en la agricultura y la alimentación, 2018, Córdoba (España).
7. **Bautista-Expósito, S.**, Peñas, E., Silván, J. M., Dueñas, M., Frias, J., Martínez-Villaluenga, C. Functionalization of lentil flour by alkaline pH fermentation and enzymatic hydrolysis to modulate metabolic syndrome. Jornada Científico-Técnica CeIA3 y VI Jornada AEL Leguminosas en la agricultura y la alimentación, 2018, Córdoba (España).

## Abreviaturas y acrónimos

<b>AACE</b>	American Association of Clinical Endocrinologists
<b>AGA</b>	Alteración de la glucosa en ayunas
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>BAL</b>	Bacterias ácido-lácticas
<b>CC</b>	Circunferencia de la cintura
<b>CCK</b>	Colecistoquinina K
<b>C-HDL</b>	Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad
<b>C-LDL</b>	Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad
<b>CT</b>	Colesterol total
<b>DGI</b>	Digestión gastrointestinal
<b>DLF</b>	Digerido gastrointestinal de lenteja fermentada
<b>DM</b>	Dieta Mediterránea
<b>DMT2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>ECA</b>	Enzima convertidora de angiotensina I
<b>EGIR</b>	European Group for the Study of Insulin Resistance
<b>EHNA</b>	Enfermedad hepática no alcohólica
<b>ERA</b>	Elemento de respuesta antioxidante
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>FAS</b>	Sintetasa de ácidos grasos
<b>FLP</b>	Fermentación con <i>Lactobacillus plantarum</i>
<b>FLPS</b>	Fermentación con <i>Lactobacillus plantarum</i> en combinación con la enzima Savinasa 16 L
<b>GABA</b>	Ácido gamma aminobutírico
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina glicosilada
<b>HS</b>	Hidrólisis con Savinasa 16 L
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria máxima media
<b>IDF</b>	International Diabetes Federation
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleuquina 1 $\beta$
<b>IL-6</b>	Interleuquina 6
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>ITG</b>	Intolerancia a la glucosa
<b>HPLC-MS/MS</b>	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MAPK</b>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
<b>MGAM</b>	Complejo maltasa-glucoamilasa
<b>MSR</b>	Metodología de superficie de respuesta
<b>NADPH</b>	Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato
<b>NCEP-ATPIII</b>	National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III

<b>NFκβ</b>	Factor de transcripción nuclear κβ
<b>NHANES</b>	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
<b>Nrf2</b>	Factor nuclear eritroide 2
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ON</b>	Óxido nítrico
<b>ORAC</b>	Capacidad de atrapar radicales de oxígeno
<b>PAD</b>	Presión arterial diastólica
<b>PAS</b>	Presión arterial sistólica
<b>PYY<sub>3-36</sub></b>	Péptido tirosina tirosina
<b>QTOF</b>	Cuadropolo de tiempo de vuelo
<b>SAPK/JNK</b>	Proteínas quinasas activadas por estrés/Jun amino-terminal quinasas
<b>SI</b>	Complejo sacarasa-isomaltasa
<b>SMet</b>	Síndrome Metabólico
<b>SOD-1</b>	Superóxido dismutasa 1
<b><i>t</i>-BHP</b>	<i>terc</i> -butil hidroperóxido
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>TNF-α</b>	Factor de necrosis tumoral α
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad

## Nomenclatura de los aminoácidos

A lo largo de esta memoria se ha utilizado la nomenclatura y simbolismos de aminoácidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB (“Nomenclature and Symbolism for Aminoacids and Peptides”), Pure and Applied Chemistry. 1984, 56, 595-674; <http://www.chem.gmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/>).

Mientras no se indique lo contrario, los aminoácidos pertenecen a la serie natural L. En cuanto a los péptidos, el residuo que tiene grupo amino libre, o no acilado por otro aminoácido, se denomina N-terminal y el que tiene un grupo carboxilo libre se denomina C-terminal. Tanto para nombrarlos como para representarlos gráficamente, se comienza por el residuo N-terminal, seguido de los aminoácidos internos en orden, para finalizar con el residuo C-terminal.

Aminoácidos	Código de 3 letras	Código de 1 letra
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteína	Cys	C
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Tirosina	Tyr	Y
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Triptófano	Trp	W
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H



# *Índice*





# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	3
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	11
2.1. SÍNDROME METABÓLICO .....	11
2.1.1. Definición e importancia .....	11
2.1.2. Prevalencia .....	13
2.1.3. Etiología.....	14
2.1.4. Prevención y control .....	17
2.2. LAS LEGUMBRES.....	21
2.2.1. Beneficios de las legumbres en el Síndrome Metabólico .....	22
2.2.2. Composición nutricional de las legumbres .....	24
2.2.2.1 Carbohidratos.....	25
2.2.2.2 Proteínas.....	27
2.2.2.3. Compuestos fenólicos.....	31
2.3. PRODUCCIÓN Y EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN ALIMENTOS MEDIANTE FERMENTACIÓN.....	35
2.3.1. Aspectos generales .....	35
2.3.2. Utilización de la fermentación para la producción de péptidos bioactivos.....	37
2.3.3. Utilización de la fermentación para la producción de compuestos fenólicos.....	39
2.4. INFLUENCIA DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL EN LA BIOACCESIBILIDAD Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS .....	42
2.4.1. Aspectos generales .....	42
2.4.2. Péptidos bioactivos .....	43
2.4.3. Compuestos fenólicos .....	44
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	47
<b>4. RESULTADOS</b> .....	51

4.1. CAPÍTULO 1. Estudio del efecto individual y combinado de los procesos de fermentación e hidrólisis enzimática a pH controlado en el perfil de compuestos bioactivos y potencial multifuncional de la fracción soluble de lenteja (publicaciones 1 y 2). .....	51
4.2. CAPÍTULO 2. Optimización de los parámetros del proceso de fermentación en combinación con la hidrólisis enzimática a pH controlado para maximizar el contenido de compuestos bioactivos y el potencial multifuncional de la fracción soluble de lenteja (publicación 3). .....	75
4.3. CAPÍTULO 3. Evaluación del escalado del proceso de fermentación en la composición y multifuncionalidad del ingrediente de lenteja desarrollado. Estudio de los mecanismos de acción antioxidante en un modelo celular de estrés oxidativo (publicación 4). .....	87
<b>5. DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>101</b>
5.1. FASE I: Estudio del efecto individual y combinado de los procesos de fermentación e hidrólisis enzimática a pH controlado en el perfil de compuestos bioactivos y potencial multifuncional de la fracción soluble de lenteja (publicaciones 1 y 2). .....	103
5.1.1. Efecto del procesado (hidrólisis enzimática, fermentación ácido láctica o combinación de ambos procesos) en el contenido y composición peptídica y fenólica de la fracción soluble de lenteja. ....	104
5.1.2. Efecto del procesado (hidrólisis enzimática, fermentación ácido láctica o combinación de ambos procesos) en la actividad biológica de la fracción soluble de lenteja.....	107
5.1.3. Caracterización de los compuestos bioactivos de la fracción soluble de lenteja obtenida mediante tratamiento combinado de fermentación e hidrólisis enzimática (FLPS).....	114
5.1.4. Efecto de la digestión gastrointestinal simulada en la bioaccesibilidad de péptidos y compuestos fenólicos y actividad biológica de la fracción soluble de lenteja obtenida mediante tratamiento combinado de fermentación e hidrólisis enzimática (FLPS).....	117
5.2. FASE II: Optimización de los parámetros del proceso de fermentación en combinación con la hidrólisis enzimática a pH controlado para maximizar el contenido de compuestos bioactivos y el potencial multifuncional de la fracción soluble de lenteja (publicación 3)...	119

5.3. FASE III: Evaluación del efecto del escalado del proceso de fermentación e hidrólisis enzimática a pH controlado en la composición y multifuncionalidad del ingrediente de lenteja desarrollado (publicación 4).....	127
5.4. FASE IV: Estudio de los mecanismos de acción antioxidante del ingrediente multifuncional desarrollado a partir de lenteja mediante fermentación e hidrólisis enzimática a pH controlado (FLPS) a escala de planta piloto (publicación 4).....	128
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>137</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>141</b>



# **Resumen**





## 1. RESUMEN

**Introducción.** El Síndrome Metabólico (SMet) se define como un conjunto de factores de riesgo cardiometabólicos. La búsqueda de estrategias de prevención aplicables al estilo de vida habitual constituye una prioridad para reducir el impacto sanitario del SMet. Si bien cada año se lanzan al mercado numerosos alimentos funcionales, hay una ausencia de alimentos multifuncionales con capacidad para actuar simultáneamente sobre los componentes del SMet.

Los beneficios de las legumbres para la prevención y el control del SMet vienen determinados por la bioaccesibilidad de sus compuestos bioactivos. En esta Tesis Doctoral se ha elegido la lenteja por su elevado contenido en compuestos fenólicos y el potencial de sus proteínas como precursores de péptidos bioactivos. Se propone la aplicación de un proceso de fermentación empleando *Lactobacillus plantarum* combinado con la adición de una proteasa comercial de calidad alimentaria (Savinasa 16 L) a pH controlado para mejorar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y péptidos de lenteja y, consecuentemente, su eficacia biológica. Si bien otros estudios han utilizado la fermentación como proceso de funcionalización de alimentos, la novedad de esta Tesis Doctoral radica en el mantenimiento del pH en valores neutros o alcalinos para maximizar la solubilidad de las proteínas, las actividades enzimáticas y la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos de la fracción soluble de lenteja obtenida considerada como ingrediente.

**Objetivo y plan de trabajo.** El objetivo general fue desarrollar un ingrediente multifuncional de lenteja enriquecido en compuestos bioactivos biodisponibles mediante un proceso combinado de fermentación e hidrólisis enzimática a pH controlado, dirigido a reducir simultáneamente la presión arterial, la absorción de glucosa y triglicéridos, el estrés oxidativo y la inflamación, principales factores de riesgo del SMet. Para ello, se estudió el efecto individual y combinado de *L. plantarum* y Savinasa 16 L en condiciones neutras y alcalinas sobre el contenido de péptidos y compuestos fenólicos de lenteja, así como sobre las actividades antioxidante e inhibidora de las enzimas convertidora de angiotensina I (ECA),  $\alpha$ -glucosidasas intestinales y lipasa pancreática.

Posteriormente, se estudió la estabilidad del potencial biológico del ingrediente a la digestión gastrointestinal (DGI). Seguidamente, se optimizaron las condiciones del proceso combinado (pH y tiempo) para maximizar el potencial multifuncional del producto fermentado mediante la metodología de superficie de respuesta. Una vez identificadas las condiciones óptimas de procesado a escala de laboratorio, se realizó un escalado del proceso a planta

piloto. Finalmente, se profundizó en los mecanismos implicados en la actividad antioxidante del producto desarrollado en un modelo celular de estrés oxidativo.

## **Resultados**

Capítulo 1. Inicialmente se evaluó el efecto combinado de la fermentación e hidrólisis enzimática a pH básico (publicación 1) y neutro (publicación 2) en el contenido de compuestos bioactivos y actividades biológicas del ingrediente procedente de lenteja. La combinación de ambos procesos, independientemente del pH utilizado, aumentó el contenido de péptidos y modificó el perfil fenólico mejorando, además, el potencial antihipertensivo, la inhibición de la digestión de carbohidratos y la actividad antioxidante de la fracción soluble de lenteja. En general, estos efectos fueron más notorios en condiciones alcalinas. La enzima Savinasa contribuyó mayormente a la producción de péptidos con actividad antihipertensiva y antioxidante mientras que *L. plantarum* influyó, principalmente, en las modificaciones de la composición fenólica de lenteja y, consecuentemente, en las actividades inhibitoras de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales y lipasa pancreática.

Los principales compuestos bioactivos identificados en la fracción soluble de lenteja fermentada en condiciones alcalinas fueron 30 péptidos con características estructurales similares a las descritas para péptidos antioxidantes e inhibidores de la ECA y las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales, así como flavonoides (publicación 1). En condiciones neutras, se identificaron 3 fragmentos peptídicos, así como glucósidos de kenferol y derivados del ácido gálico (publicación 2).

Finalmente, se estudió el efecto de la DGI *in vitro* en el contenido de compuestos bioactivos y actividades biológicas de la fracción soluble de lenteja procesada en ambas condiciones de pH. La DGI aumentó el contenido de péptidos y compuestos fenólicos totales, efecto que no se correlacionó, sin embargo, con una mejora en la actividad biológica global del digerido gastrointestinal (publicación 1 y 2).

Capítulo 2. Para maximizar la producción de compuestos bioactivos y el potencial multifuncional del ingrediente, se optimizaron las condiciones del proceso (pH y tiempo) mediante la metodología de superficie de respuesta (publicación 3). Los resultados indicaron que ambos factores influyeron notablemente en el contenido de péptidos, compuestos fenólicos, en las actividades inhibitoras de la ECA y lipasa, y antioxidante de la fracción soluble de lenteja, si bien no afectaron significativamente a las actividades inhibitoras de  $\alpha$ -glucosidasas intestinales y antiinflamatoria. Se identificaron valores de pH 8,5 y tiempo de 11 h y 36 min como las condiciones óptimas de procesado.

**Capítulo 3.** El escalado a nivel de planta piloto disminuyó el rendimiento de péptidos y compuestos fenólicos y la eficacia biológica global del ingrediente procedente de la fracción soluble de lenteja, con excepción de la actividad antioxidante, que aumentó con respecto a la producción a escala de laboratorio (publicación 4).

Se estudió el mecanismo de acción antioxidante del ingrediente desarrollado después de la DGI en un modelo celular de estrés oxidativo (publicación 4). Los resultados revelaron que el digerido inhibió la formación de especies reactivas de oxígeno intracelulares mitigando la citotoxicidad inducida por un agente oxidante. El efecto antioxidante estuvo mediado por el aumento de la fosforilación de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), de la expresión de enzimas antioxidantes y la translocación al núcleo del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2).

**Conclusiones.** El proceso combinado de fermentación e hidrólisis enzimática a pH controlado abre nuevas posibilidades de revalorización de la lenteja mediante la producción de ingredientes multifuncionales. El pH y el tiempo fueron factores claves del proceso, identificándose las condiciones óptimas para maximizar el potencial multifuncional de lenteja (pH 8,5; tiempo 11 h y 36 min). La DGI del producto fermentado mejoró la bioaccesibilidad de péptidos y compuestos fenólicos, si bien se observó una reducción de la actividad biológica global, efecto también observado tras el escalado. Tras la DGI, el producto fermentado ejerció un efecto citoprotector frente al estrés oxidativo mediante la activación de las rutas de señalización de las MAPK, la translocación al núcleo de Nrf2 y la expresión de enzimas antioxidantes.

## SUMMARY

**Introduction.** The Metabolic Syndrome (MetS) is defined as a group of cardiometabolic risk factors. The search for prevention strategies applicable to the usual lifestyle constitutes a priority to reduce the health impact of MetS. Despite the fact that many functional foods are launched on the market every year, there is an absence of foods with the ability to act simultaneously on the components of MetS.

The benefits of legumes for prevention and control of MetS are closely determined by the bioavailability of bioactive compounds. In this Doctoral Thesis, lentil was chosen owe to its high content of phenolic compounds and the potential of its proteins as precursors of bioactive peptides. In the present study the application of a fermentation process using *Lactobacillus plantarum* as a starter culture combined with the addition of a commercial protease (Savinase 16 L) at a controlled pH has been chosen as a strategy to improve the

bioavailability of phenolic compounds and bioactive peptides from lentil, and therefore, its biological effectiveness. Although there are studies in which fermentation has been used as a food functionalization process, the novelty of this Doctoral Thesis lies in the maintenance of pH in neutral or alkaline values during fermentation in order to maximize the solubility of proteins, enzymatic activities and the bioavailability of bioactive compounds.

**Objective and work plan.** The general objective was to develop a multifunctional ingredient from lentil enriched in bioavailable bioactive compounds through the use of a fermentation process in combination with enzymatic hydrolysis at controlled pH aimed at reducing blood pressure, glucose and triglyceride absorption, oxidative stress and inflammation at the same time. To this end, the individual and combined effects of *L. plantarum* and Savinase 16 L under neutral and alkaline pH conditions on peptides and phenolic contents as well as antioxidant and inhibitory efficacy towards angiotensin I-converting enzyme (ACE), intestinal  $\alpha$ -glucosidases and pancreatic lipase were studied.

Subsequently, the stability of the biological potential of the fermented product to gastrointestinal digestion was evaluated. Then, the conditions of the combined process (pH and time) were optimized to maximize the multifunctional potential of the fermented product through the response surface methodology. Once the optimal processing conditions were identified at the laboratory scale, the process was scaled-up to a pilot plant. Finally, the mechanisms involved in the antioxidant activity of the product developed were studied in a cellular model of oxidative stress.

## **Results.**

**Chapter 1.** Firstly, the combined effect of fermentation and enzymatic hydrolysis at basic (paper 1) and neutral pH (paper 2) on the content of bioactive compounds and biological activities of the soluble fraction of lentil was evaluated. The combination of both processes, regardless of pH values, increased the peptide content and modified the phenolic profile, improving, at the same time, the antihypertensive potential, the inhibition of the carbohydrate digestion and the antioxidant activity of lentil soluble fraction. Generally, these effects were more noticeable when the process was performed in alkaline conditions. The enzyme Savinase contributed mainly to the production of peptides with antihypertensive and antioxidant activities while *L. plantarum* mainly affected to phenolic composition and, consequently, to the inhibitory activities of intestinal  $\alpha$ -glucosidases and pancreatic lipase.

The main bioactive compounds identified in the lentil soluble fraction obtained at alkaline pH were 30 peptides that showed similar structural characteristics to those described

for antioxidant, ACE and  $\alpha$ -glucosidases-inhibitory peptides (paper 1). At neutral pH, 3 main protein fragments as well as kaempferol glycosides and gallic acid derivatives were detected (paper 2).

Finally, the effect of *in vitro* gastrointestinal digestion (GID) on the content of bioactive compounds and biological activities of the soluble fraction of lentil processed in the different pH conditions was studied. In both cases, GID increased the content of peptides and total phenolic compounds, however, these effects did not correlate with an improvement in the array of biological activities of the lentil fermented product (paper 1 and 2).

Chapter 2. With the aim to maximize the production of bioactive compounds and multifunctional potential of the lentil soluble fraction, processing parameters (pH and time) were optimized by using the response surface methodology (paper 3). The results indicated that both factors notably influenced the content of peptides, phenolic compounds, ACE and lipase inhibitory potency as well as antioxidant activity of lentil soluble fraction. Values of pH 8.5 and time of 11 h and 36 min were identified as the optimal processing conditions.

Chapter 3. A scaling-up at pilot plant level the fermentation and enzymatic hydrolysis at alkaline pH resulted in a lower yield of peptides and phenolic compounds and decreased the overall biological effectiveness of the lentil soluble fraction with the exception of the antioxidant activity, which increased significantly with respect to the one produced at laboratory scale (paper 4).

Mechanisms involved in the antioxidant action of lentil were studied after GID using an *in vitro* cellular model of oxidative stress (paper 4). The results revealed that the fermented lentil soluble fraction inhibited the formation of intracellular reactive oxygen species by mitigating the cytotoxicity induced by an oxidizing agent. The antioxidant effects were mediated by the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPK), the increase in the expression of antioxidant enzymes and nuclear translocation of nuclear factor erythroid 2 (Nrf2).

**Conclusions.** The combination of fermentation and enzymatic hydrolysis at controlled pH opens new possibilities for lentil valorization through production of multifunctional ingredients. The pH and time were key factors of the process, being pH values of 8.5 and a time of 11 h and 36 min the optimal conditions to maximize the multifunctional potential of lentil. GID of fermented lentil soluble fraction improved the bioavailability of peptides and phenolic compounds, although a reduction was observed in the overall set of biological activity of the final product developed. The reduction of the multifunctional potential of lentil soluble

fraction was also observed after scaling-up the process at pilot plant level. After GID, the fermented product exerted a cytoprotective effect against oxidative stress by activating the MAPK signaling, the translocation to the nucleus of Nfr2 and the expression of antioxidant enzymes.

# **Introducción**





## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. SÍNDROME METABÓLICO

#### 2.1.1. Definición e importancia

El Síndrome Metabólico (SMet) se define como un conjunto de factores de riesgo interrelacionados entre sí que engloban la obesidad abdominal, el metabolismo alterado de la glucosa, la presión arterial elevada y la dislipemia (niveles elevados de triglicéridos o TG y reducidos los de colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad o C-HDL) (Pistollato y Battino, 2014).

Esta enfermedad constituye un problema de salud pública de gran importancia a nivel global y diferentes estudios epidemiológicos indican que su incidencia está aumentando de manera alarmante, afectando a gran parte de la población mundial, tanto adultos como niños. El SMet deteriora la calidad de vida de las personas que lo padecen y aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y trastornos metabólicos graves (Alegría-Ezquerria y col., 2008). Además, el desarrollo del SMet lleva asociado un incremento considerable de los costes sanitarios, debilitando la economía de los países en los que su incidencia es elevada. En Estados Unidos se estima que el incremento de los costes sanitarios derivados del SMet es de aproximadamente un 24% (Aguilar y col., 2015; Boudreau y col., 2009). En España, el coste sanitario estimado debido al SMet en 2008 fue de 1.909 millones de euros. Teniendo en cuenta el ritmo de aumento de su incidencia, se prevé que el gasto sanitario derivado del SMet para 2020 ascienda a 5.328 millones de euros (Piñol y col., 2011; Scholze y col., 2010).

Actualmente existen varios criterios para el diagnóstico del SMet definidos por organizaciones relevantes como la *Organización Mundial de la Salud* (OMS), el *European Group for the Study of Insulin Resistance* (EGIR), el *National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATPIII), la *American Association of Clinical Endocrinologists* (AACE) y la *International Diabetes Federation* (IDF). Estos criterios se resumen en la **Tabla 1**. En la práctica clínica, los criterios diagnósticos más utilizados son aquellos desarrollados por NCEP-ATPIII y por la IDF (Rodríguez-Monforte y col., 2017).

**Tabla 1.** Criterios para el diagnóstico clínico del Síndrome Metabólico propuestos por distintas organizaciones internacionales.

Parámetros clínicos	OMS (1998)	EGIR (1999)	NCEP-ATPIII (2001)	AACE (2003)	IDF (2005)
<b>Resistencia a la insulina</b>	ITG, AGA, DMT2 o baja sensibilidad a la insulina <sup>a</sup>	Insulina en plasma > 75%	-	ITG o AGA	-
<b>Peso corporal</b>	Relación cintura–cadera > 0,90 en H Relación cintura–cadera > 0,85 en M y/o IMC > 30 kg/m <sup>2</sup>	CC ≥ 94 cm en H o ≥ 80 cm en M	CC ≥ 120 cm en H o ≥ 88 cm en M	IMC > 25 kg/m <sup>2</sup>	CC incrementada (específico de la población)
<b>Lípidos</b>	TG ≥ 150 mg/dL y/o C-HDL < 35 mg/dL en H o < 39 mg/dL en M	TG ≥ 150 mg/dL y/o C-HDL < 39 mg/dL en H o M	TG ≥ 150 mg/dL C-HDL < 40 mg/dL en H o < 50 mg/dL en M	TG ≥ 150 mg/dL C-HDL < 40 mg/dL en H o < 50 mg/dL en M	TG ≥ 150 mg/dL o TG en tratamiento C-HDL < 40 mg/dL en H o < 50 mg/dL en M o C-HDL en tratamiento
<b>Presión arterial</b>	≥ 140 / 90 mm Hg	≥ 140 / 90 mm Hg o en hipertensión en tratamiento	≥ 130 / 85 mm Hg	≥ 130 / 85 mm Hg	≥ 130/85 mm Hg o hipertensión en tratamiento
<b>Glucosa</b>	ITG, AGA o DMT2	ITG o AGA (pero no la DMT2)	> 110 mg/dL (incluida la DMT2)	ITG o AGA (pero no la DMT2)	> 100 mg/dL (incluida la DMT2) <sup>b</sup>
<b>Otros</b>	Microalbuminuria: tasa de excreción urinaria > 20 mg/min o proporción de albúmina:creatinina > 30 mg/g	-	-	Otras características de la resistencia a la insulina <sup>c</sup>	-

<sup>a</sup>Sensibilidad a la insulina medida bajo condiciones euglucémicas–hiperinsulinémicas. Absorción de glucosa por debajo del cuartil más inferior para la población investigada.

<sup>b</sup>En 2003 la *American Diabetes Association* cambia el criterio para la intolerancia de la glucosa en ayunas a > 100 mg/dL.

<sup>c</sup>Incluye antecedentes familiares de DMT2, síndrome de ovario poliquístico, estilo de vida sedentario, edad avanzada y grupos étnicos susceptibles de padecer DMT2. AGA: alteración de la glucosa en ayunas; CC: circunferencia de la cintura; C-HDL: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad; DMT2: diabetes mellitus tipo 2; H: hombres; IMC: índice de masa corporal; ITG: intolerancia a la glucosa; M: mujeres; TG: triglicéridos.

### 2.1.2. Prevalencia

El estudio de la prevalencia del SMet permite obtener una aproximación epidemiológica a nivel poblacional sobre su incidencia. De acuerdo con los criterios diagnósticos propuestos por la IDF (2014), se estima que el 25% de la población mundial adulta padece SMet. En Europa, según la NCEP-ATPIII, la prevalencia se encuentra entre el 9,6% y el 55,7% (Day, 2007). No obstante, la prevalencia del SMet es difícil de establecer debido en parte a las diferencias metodológicas utilizadas para la determinación de su frecuencia y a la existencia de factores que influyen en ella como son el ambiente (rural o urbano) y la composición de la población estudiada (edad, sexo, etnia, sobrepeso y obesidad o presentar una enfermedad cardiovascular previa).

En los últimos años, la prevalencia mundial del SMet ha aumentado de forma paralela al incremento de la prevalencia de la obesidad, aumentando también con el avance de la edad (Ascaso y col., 2006). La última encuesta nacional de examen sobre salud y nutrición realizada en Estados Unidos (National Health and Nutrition Examination Survey – NHANES) ha estimado que el 30% de hombres y mujeres con sobrepeso y el 60% con obesidad cumplen los criterios de diagnóstico del SMet por los que se rige la NCEP-ATPIII (Ervin, 2009). Además, se ha demostrado que el sobrepeso incrementa la incidencia de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), de modo que las medidas dirigidas al control del sobrepeso contribuyen tanto a reducir el riesgo de padecer DMT2 como de SMet (Nguyen y col., 2011; Zhang y col. 2015). Con respecto a la edad, se estima que el 35% de los adultos mayores de 20 años y el 50% de los mayores de 60 años en Estados Unidos tienen SMet en base a los criterios diagnósticos de la NCEP-ATPIII (Aguilar y col., 2015). Además, estos datos se relacionan con el hecho de que, en este país, el 70% de los adultos tienen sobrepeso, de los cuales el 35% se consideran obesos (Ogden y col., 2014). En España, los datos de prevalencia analizados mediante el Registro Nacional de SMet en Sujetos Activos, muestran también que la prevalencia en la población crece de forma exponencial con respecto a la edad de los individuos, con una incidencia del 2,1% en mujeres y 3,5% en hombres con edades comprendidas entre 21 y 25 años, aumentando hasta valores de 17,9% y 26,2%, respectivamente, en edades entre 61 y 65 años (Alegría-Ezquerro y col., 2008).

La relación de la prevalencia del SMet y el sexo es compleja de plasmar de forma universal, debido a que los estudios realizados han mostrado variaciones entre hombres y mujeres según el país de origen. Estas diferencias pueden estar relacionadas, por ejemplo, con el estatus socioeconómico, el tipo de trabajo, la cultura o la educación de cada país (Cornier y col., 2008).

Aunque no existe consenso en los criterios diagnósticos del SMet, la tendencia general observada es un incremento de la prevalencia en España entre un 12% y un 31% (Cordero y col., 2005; Fernández-Bergés y col., 2012). Este aumento está relacionado con el incremento de los factores de riesgo asociados al SMet. Por ejemplo, en 2008 la hipertensión asociada a personas con SMet, basándose en los criterios de la NCEP-ATPIII, mostró tener una prevalencia del 11% y se prevé un incremento en torno al 22% para el año 2020. Para el mismo año, también se estima un aumento de la prevalencia de factores como la obesidad, la DMT2, la hipertrigliceridemia y una disminución de los niveles de C-HDL (Piñol y col., 2011).

### **2.1.3. Etiología**

La patogénesis del SMet es compleja debido a los múltiples factores genéticos, ambientales y epigenéticos que influyen en el desarrollo del conjunto de elementos que contribuyen al desarrollo de este síndrome.

La dieta y el estilo de vida son factores clave en el desarrollo del SMet (Cornier y col., 2008; García-Toro y col., 2016). En este sentido, el sedentarismo y una alimentación poco saludable basada en un consumo elevado de alimentos hipercalóricos con alto contenido en grasas, azúcares y sal predisponen a su aparición. El consumo de tabaco y alcohol también contribuye a su desarrollo y agravamiento (Ascaso y col., 2006). Por otro lado, la presencia de ciertas enfermedades como la cardiopatía isquémica incrementan considerablemente el riesgo de sufrir SMet (Ascaso y col., 2006). En la **Figura 1** se esquematizan los diferentes factores implicados en el SMet y sus posibles riesgos.

La dimensión patológica del SMet es muy relevante por su asociación con el desarrollo de DMT2 y enfermedad arterioesclerótica cardiovascular, así como múltiples disfunciones orgánicas sobre numerosos sistemas entre los que se encuentra el hígado, donde la manifestación de este síndrome se conoce como enfermedad hepática no alcohólica (EHNA).



**Figura 1.** Factores implicados en el desarrollo del Síndrome Metabólico y sus posibles riesgos.

Dentro de los procesos que intervienen en el desarrollo del SMet, la obesidad y la resistencia a la insulina juegan un papel central. Las personas con sobrepeso u obesidad, sedentarias y que consumen una dieta rica en grasas saturadas y carbohidratos son más propensas a padecer baja sensibilidad a la insulina o insulinoresistencia (Tan y col., 2017) pudiendo desencadenar el SMet a largo plazo. La obesidad se caracteriza principalmente por la acumulación de tejido adiposo visceral. Se ha descrito que este tejido promueve la resistencia a la insulina y un estado pro-inflamatorio en el organismo que contribuyen al desarrollo del SMet. La urgencia de metabolizar la sobrecarga de nutrientes de la ingesta excesiva de alimentos y el bajo gasto energético asociado a una actividad física deficiente en personas obesas somete a las células a un estrés metabólico que inicia y perpetúa las cascadas oxidativas e inflamatorias, provocando daños en la señalización de la insulina y resistencia de los tejidos a la acción hormonal (Muñoz-Contreras y col., 2013).

El exceso de grasa visceral está asociado a la insulinoresistencia debido a las particularidades metabólicas de este tipo de grasa, como la mayor tendencia a la lipólisis, un aumento de la actividad de los receptores de glucocorticoides y una mayor secreción de citoquinas proinflamatorias reduciendo, a su vez, la secreción de adipocitoquinas sensibles a la insulina (Muñoz-Contreras y col., 2013). Las adipocitoquinas son sustancias biológicamente activas secretadas por el tejido adiposo visceral que influyen en la regulación de la homeostasis energética, sensibilidad insulínica y metabolismo de lípidos y carbohidratos (Havel, 2004). La alteración de la concentración de adipocitoquinas induce la expresión de

citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la interleuquina 6 (IL-6), causando resistencia a la insulina e inflamación sistémica. El aumento de tejido adiposo, además, produce una liberación de ácidos grasos al torrente circulatorio, que causan estrés oxidativo y reducen la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético inhibiendo la captación de glucosa mediada por insulina en células musculares. Este fenómeno causa un exceso de los niveles de glucosa en el torrente sanguíneo que incrementa la secreción de insulina a nivel pancreático, dando lugar a una hiperinsulinemia. En el hígado, el exceso de ácidos grasos causa su re-esterificación para formar TG, que se incorporan en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) que son secretadas al torrente sanguíneo. Las VLDL que circulan por el sistema sanguíneo pueden ser filtradas por la pared arterial e incorporadas a los macrófagos, desarrollando una placa fibrosa que desemboca en aterosclerosis o en la formación de trombos. El tejido adiposo también secreta angiotensinógeno, que causa hipertensión arterial, otro de los factores de riesgo del SMet (Grundy, 2016).

La insulinoresistencia, como ya se ha mencionado, juega un papel clave en el desarrollo del SMet. Los individuos con resistencia a la insulina muestran un metabolismo alterado de la glucosa, niveles elevados de glucosa en ayunas y/o hiperglucemia, o reducción de la acción de la insulina. Estas personas no son capaces de secretar insulina suficiente para compensar los niveles de glucosa en sangre. Su persistencia origina a largo plazo DMT2, otro de los factores de riesgo del SMet que se caracteriza por la pérdida progresiva de la acción de la insulina y resistencia a la misma, seguida por la disfunción de las células  $\beta$  del páncreas, lo que deriva en una hiperglucemia crónica y alteraciones en el metabolismo de la glucosa (Ibrahim y col., 2014).

La insulinoresistencia en el SMet conduce, a su vez, a la liberación en exceso de ácidos grasos libres al torrente circulatorio. En condiciones normales, la insulina inhibe la acción de la hormona sensible a la lipasa, encargada de convertir los TG en ácidos grasos libres. Sin embargo, en individuos con resistencia a la insulina esta hormona es incapaz de inhibir la lipólisis lo que origina una liberación elevada de ácidos grasos libres al torrente sanguíneo, que se re-esterificarán en TG, como se ha comentado anteriormente, creando un ciclo que genera nuevamente estrés oxidativo e inflamación (McCracken y col., 2018). Esta situación lleva asociadas otras alteraciones metabólicas como la dislipemia, caracterizada por la alteración homeostática de los ácidos grasos, TG y lipoproteínas; daño en la regulación central de ingesta y saciedad debido al deterioro en la integración de señales relacionadas con la situación energética del organismo e hipertensión por la activación del sistema nervioso simpático y del sistema renina-angiotensina (Muñoz y col. 2013).

#### 2.1.4. Prevención y control

La prevención del SMet tiene una gran trascendencia tanto a nivel clínico como epidemiológico ya que se considera un precursor identificable y corregible de la DMT2 y enfermedades cardíacas y cerebrovasculares (Ascaso y col., 2006). Actualmente, las estrategias principales para la prevención y control del SMet consisten en modificaciones del estilo de vida. Entre las recomendaciones para evitar la aparición de este síndrome o mitigar los factores de riesgo se incluyen la realización de ejercicio físico diario y cambios en la dieta. Las dietas adecuadas para la prevención y control del SMet siguen siendo inespecíficas y dirigidas hacia el control del peso y la reducción de la ingesta calórica total. Diversas evidencias muestran que estas dietas deben ser bajas en grasas saturadas, grasas *trans*, colesterol, sodio y azúcares simples (De Sousa y Norman, 2016; Martínez y col., 2016). Se ha demostrado que un estilo de vida saludable caracterizado por una dieta equilibrada en combinación con la realización de ejercicio físico regularmente puede reducir la prevalencia del SMet hasta en un 45% (Cornier y col., 2008).

Si bien no existe una recomendación dietética a nivel global para prevenir el conjunto de factores que constituyen el SMet, en la actualidad diferentes asociaciones relacionadas con el ámbito de la salud como la Federación Mundial del Corazón, la Asociación Americana de la Diabetes y la Fundación Española del Corazón han establecido una serie de recomendaciones dietéticas para la prevención de factores de riesgo individuales asociados con el desarrollo de este síndrome. Así, por ejemplo, en Europa, Estados Unidos, China y Japón se han establecido directrices para evitar el desarrollo de la hipertensión, que consisten en la restricción del consumo de sal y grasas saturadas, promoción del consumo de verduras y frutas, así como la ingesta de pescado, consumo moderado de alcohol, control del peso corporal, realizar ejercicio físico regularmente y evitar el tabaco (Kokubo, 2014). Las dietas comúnmente recomendadas para prevenir y controlar el desarrollo de los factores de riesgo asociados al SMet se recogen en la **Tabla 2**. Estas dietas se basan fundamentalmente en la restricción de la ingesta energética mediante el consumo de alimentos bajos en calorías para favorecer la movilización de grasas y la pérdida de peso, el control de la glucemia y la disminución de la producción de moléculas proinflamatorias, así como de colesterol total (CT) y colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) (Grams y Garvey, 2015; Rossmeslova y col., 2013; Wing y col., 2011). Las dietas ricas en ácidos grasos  $\omega$ -3 han demostrado también ser efectivas para disminuir los procesos inflamatorios y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares debido a que son capaces de reducir los niveles de citoquinas proinflamatorias en plasma, así como de los TG y del C-LDL (Fleming y Kris-Etherton, 2014; Lopez-Huertas, 2012). Las dietas

caracterizadas por un índice glucémico bajo permiten prevenir el desarrollo de DMT2, ya que conducen a una lenta absorción de carbohidratos mejorando el control glucémico en personas con alteraciones en el metabolismo de la glucosa (Gibbs y col., 2014; Thomas y Elliot, 2009). Las dietas que incluyen un elevado consumo de compuestos antioxidantes conducen a una reducción del estrés oxidativo y, consecuentemente, de los procesos de inflamación que, como se ha explicado previamente, están relacionados con el desarrollo del SMet (Harasym y Oledzki, 2014; Micha y col., 2017). También hay que señalar que las dietas que se caracterizan por una ingesta moderada-alta de proteínas son efectivas para controlar el peso corporal ya que no sólo incrementan la saciedad, sino que activan procesos catabólicos con alto consumo energético, causando una pérdida de peso. Finalmente, una de las dietas más recomendadas para controlar las alteraciones asociadas al SMet es la dieta Mediterránea (DM) (Esposito y col., 2015; Kastorini y col., 2011; Kesse-Guyot y col., 2013; Shen y col., 2015). La DM tradicional está basada en un consumo frecuente de verduras, legumbres, fruta, cereales y aceite de oliva, consumo moderado de pescado, ingesta baja a moderada de derivados lácteos y bajo consumo de carne y vino. Hay estudios que han demostrado que existe una fuerte relación entre la DM y bajas ganancias de peso corporal o, incluso, pérdida de peso (Kastorini y col., 2011; Kesse-Guyot y col., 2013). Otros han demostrado que la DM tiene efectos beneficiosos en la disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Mayr y col., 2018).

A pesar de los beneficios saludables de estas dietas, los patrones dietéticos de la población actual en países desarrollados se alejan cada vez más de ellas debido al ritmo de vida actual. En este contexto, sin duda el consumo de alimentos funcionales como parte de una dieta saludable constituye uno de los puntos de anclaje en la reducción del riesgo de enfermedades relacionadas con el SMet y el mantenimiento del buen estado de salud.

**Tabla 2.** Efectos beneficiosos de diferentes patrones e intervenciones dietéticas en la prevención y control del Síndrome Metabólico.

Patrón dietético	Factores metabólicos mejorados	Mecanismos implicados	Referencias
<b>Dietas con restricción calórica</b>	Obesidad	Lipólisis	(Grams y Garvey, 2015; Rossmeislova y col., 2013; Wing y col., 2011)
	DMT2	Mejora de glucemia y resistencia a la insulina	
	Inflamación	↓ marcadores de inflamación (IL-6)	
	Enfermedades cardiovasculares	Mejora del perfil de colesterol y ↓ PAD, PAS y TG	
<b>Dietas ricas en ácidos grasos ω-3</b>	Inflamación	↓ citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF-α)	(Fleming y Kris-Etherton, 2014; Lopez-Huertas, 2012)
	Enfermedades cardiovasculares	↓ TG, VLDL	
<b>Dietas con índice glucémico bajo</b>	DMT2	↓ HbA1c y fructosamina	(Gibbs y col., 2014; Thomas y Elliott, 2009)
<b>Dietas ricas en antioxidantes</b>	Estrés oxidativo	Neutralización de radicales libres	(Harasym y Oledzki, 2014; Micha y col., 2017)
<b>Dietas con ingesta moderada-alta de proteínas</b>	Obesidad	↑ saciedad y termogénesis	(Bendtsen y col., 2013; Bray y col., 2012)
<b>Dieta Mediterránea</b>	DMT2	Control glicémico, ↓ HbA1c, ↓ niveles de glucosa en ayunas	(Esposito y col., 2015; Kastorini y col., 2011; Kesse-Guyot y col., 2013; Mayr y col., 2018; Shen y col., 2015)
	Enfermedades cardiovasculares	↓ CT, C-LDL, TG y ↑ C-HDL	
	Obesidad	↑ saciedad y ↓ peso corporal y CC	

CC: circunferencia de la cintura; C-HDL: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad; C-LDL: colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad; CT: colesterol total; DMT2: diabetes mellitus tipo 2; HbA1c: hemoglobina glicosilada; IL-6: interleuquina 6; PAD: presión arterial diastólica; PAS: presión arterial sistólica; TG: triglicéridos; TNF-α: factor de necrosis tumoral α; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

Los alimentos funcionales, más allá de sus efectos puramente nutricionales, influyen positivamente sobre la salud o sobre una determinada función fisiológica que resulta beneficiosa para la salud (Latocha, 2017; Pelvan y col., 2018). El diseño de un alimento funcional puede incluir la eliminación de un componente conocido con efecto no beneficioso, el aumento de la concentración de un componente beneficioso presente de forma natural en un alimento o la adición de un componente al que se le ha descrito un efecto beneficioso (Crowe y Francis, 2013).

La mayoría de los alimentos funcionales comerciales contienen compuestos bioactivos dirigidos únicamente hacia una diana fisiológica. En este sentido, cabe destacar los alimentos ricos en fitoesteroles, ácidos grasos  $\omega$ -3 o  $\beta$ -glucano, dirigidos a la reducción de los niveles de colesterol plasmático (bebidas fermentadas, galletas o margarinas), aquellos que contienen péptidos bioactivos que ayudan a reducir la tensión arterial o bien con efecto saciante para controlar el peso corporal o zumos ricos en compuestos antioxidantes (**Figura 2**). Dado que el SMet no afecta a un órgano o diana único sobre el cual dirigir una terapia preventiva específica, el desarrollo de alimentos multifuncionales podría constituir una estrategia más eficaz para revertir o controlar el SMet de forma global. Esta línea de investigación es aún incipiente y no se encuentran disponibles actualmente productos en el mercado con estas características.



**Figura 2.** Ejemplos de alimentos funcionales que se pueden encontrar en el mercado dirigidos a la regulación de un proceso fisiológico diana: niveles de colesterol en sangre, tensión arterial, saciedad o estrés oxidativo.

Para que un ingrediente sea considerado como multifuncional tiene que haber demostrado de forma satisfactoria que posee un efecto beneficioso sobre varias funciones específicas del organismo y que puede ejercer sus actividades biológicas *in vivo* sin producir efectos adversos, ya sean toxicológicos o nutricionales. La evaluación de la multiactividad de un ingrediente puede realizarse de manera complementaria mediante pruebas químicas (por ejemplo, determinación del contenido teórico de compuestos bioactivos), biológicas *in vitro* sobre varios modelos biológicos e *in vivo* en animales y humanos tras la ingesta de los mismos. Dado que la evaluación de la actividad biológica *in vivo* es costosa, se considera más conveniente realizar inicialmente estudios *in vitro* para acotar y definir los términos de estudios posteriores en animales y humanos. En este sentido, los estudios *in vitro* con cultivos celulares son una herramienta útil para la evaluación de la actividad biológica ya que permite simular estados fisiológicos a escala de laboratorio y elucidar el mecanismo de acción y el efecto beneficioso tanto de compuestos puros como de alimentos ricos en compuestos bioactivos (Brien y col., 2000; Yuk-Young y col., 2002).

Los alimentos de origen vegetal y, entre ellos las legumbres, constituyen una materia prima interesante para la obtención de ingredientes funcionales debido a su singular composición en nutrientes y compuestos bioactivos que pueden contribuir a reducir el riesgo asociado al SMet.

## **2.2. LAS LEGUMBRES**

Las legumbres son plantas anuales pertenecientes a la familia *Fabaceae* (también conocida como *Leguminosae*) entre las que se encuentran el guisante (*Pisum sativum* L.), la judía común (*Phaseolus vulgaris* L.), la lenteja (*Lens culinaris* Medik.), el haba (*Vicia faba*), el altramuz (*Lupinus* spp. L.) y el garbanzo (*Cicer arietinum* L.). La *Food Agricultural Organization* (FAO) considera legumbres únicamente a las semillas secas recolectadas de cultivos de plantas leguminosas, excluyendo las plantas frescas como las judías verdes que son consideradas hortalizas. También son excluidas de esta definición aquellas leguminosas destinadas a la extracción de aceites como la soja, y las cultivadas exclusivamente con fines de siembra como la alfalfa.

### **2.2.1. Beneficios de las legumbres en el Síndrome Metabólico**

Las legumbres están cobrando cada vez más importancia en la prevención y control del SMet. En los últimos años, se han publicado un gran número de estudios clínicos que demuestran los beneficios saludables de las legumbres en la prevención de los factores de riesgo asociados a este síndrome (**Tabla 3**). En estos estudios se describen efectos beneficiosos en pacientes con alteraciones metabólicas asociadas al SMet tras la ingesta de una a 5 raciones de legumbres a la semana durante un periodo de tiempo variable de entre 21-181 días. Los estudios de intervención nutricional en humanos, en general, demuestran que una dieta rica en legumbres reduce los niveles de glucosa, C-LDL en sangre y la presión arterial, así como el estrés oxidativo y la inflamación aumentando, además, la sensación de saciedad que ayuda a reducir el peso corporal (Hosseinpour-Niazi y col., 2012; Mollard y col., 2012; Reverri y col., 2015 y 2017).

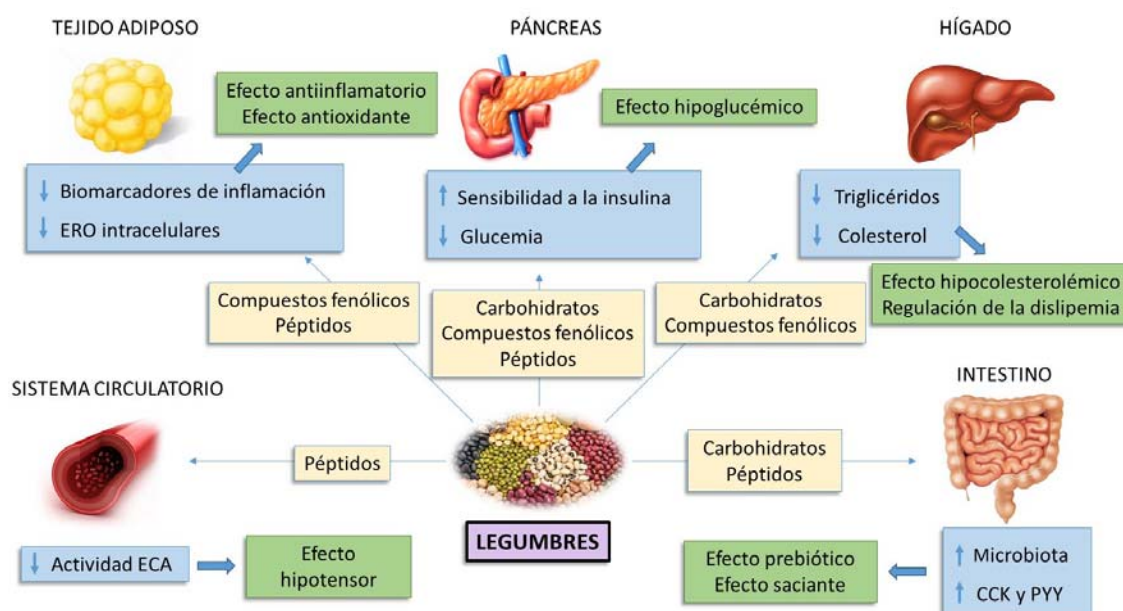
**Tabla 3.** Ensayos clínicos de intervención que muestran el efecto del consumo de legumbres en los factores de riesgo asociados al Síndrome Metabólico.

Diseño experimental/Individuos participantes	Dieta	Dosis	Duración (días)	Efecto observado	Referencia
Paralelo/hombres y mujeres (n=40) con SMet	Rica en legumbres (guisantes amarillos, garbanzos, judías blancas y lentejas)	5 tazas de legumbres/semana (consumo medio 896 g/semana)	56	Reducción de la CC, PAS y HbA1c. Aumento de los niveles de C-HDL. Mejora el control glucémico, la sensibilidad a la insulina y los niveles de glucosa postprandial.	(Mollard y col., 2012)
Paralelo/hombres y mujeres (n=80) con SMet	Rica en legumbres (lentejas, judías, garbanzos, habas y guisantes)	1,4 raciones/semana	181	Reducción de la PAS y glucosa en sangre en ayunas. Aumento de los niveles de C-HDL.	(Hosseinpour-Niazi y col., 2012)
Cruzado/hombres y mujeres (n=12) con SMet	Rica en judías negras	1 ración/semana	21	Reducción de la glucemia postprandial y el estrés oxidativo.	(Reverri y col., 2015)
Cruzado/hombres y mujeres (n=12) con SMet	Rica en judías negras	1 ración/semana	21	Incremento de la concentración de péptidos intestinales con efecto saciante (CCK y PYY <sub>3-36</sub> ) y mejora la sensibilidad a la insulina postprandial.	(Reverri y col., 2017)

CC: circunferencia de la cintura; CCK: colecistoquinina K; C-HDL: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad; HbA1c: hemoglobina glicosilada; PAS: presión arterial sistólica; PYY<sub>3-36</sub>: péptido tirosina tirosina.

Estos efectos beneficiosos para la salud de las legumbres pueden atribuirse a su composición nutricional y a la presencia de compuestos bioactivos con diferentes actividades biológicas (antioxidante, antiinflamatoria, antihipertensiva y antidiabética), que sugieren un gran potencial de las legumbres para el desarrollo de alimentos funcionales dirigidos al control del SMet (De la Iglesia y col., 2016; Miglani y Bains, 2017).

Los macronutrientes y compuestos bioactivos presentes en las legumbres actúan sinérgicamente. Los mecanismos por los que las legumbres podrían tener un efecto protector frente al SMet se han propuesto en la **Figura 3**. Entre ellos se encuentra la fermentación de la fibra en el colon (efecto prebiótico) y las propiedades antioxidantes, hipoglucémicas, hipolipémicas, antiinflamatorias y saciantes de los diferentes compuestos bioactivos como se detalla más adelante.



**Figura 3.** Mecanismos de acción de los compuestos bioactivos de legumbres implicados en el control de los componentes del SMet.

ERO: especies reactivas de oxígeno; ECA: enzima convertidora de angiotensina-I; CCK: colecistoquinina K; PYY<sub>3-36</sub>: péptido tirosina tirosina

### 2.2.2. Composición nutricional de las legumbres

Las legumbres poseen un alto valor nutricional, como se recoge en la **Tabla 4**. Son alimentos con alto contenido de proteínas (20%-36%), carbohidratos (40-63%) y micronutrientes esenciales como vitaminas del complejo B (ácido fólico, tiamina y riboflavina) y minerales

como el potasio, hierro, calcio, magnesio y zinc (Campos-Vega y col., 2010). El perfil aminoacídico de las legumbres es complementario al de los cereales, recomendándose su consumo de forma combinada para aumentar la calidad de la proteína total. Esta complementariedad obedece a que la lisina es el aminoácido limitante en los cereales mientras que la metionina lo es en las legumbres. Las legumbres presentan un contenido lipídico bajo (1-10%). El contenido medio de lípidos totales en judía, lentejas y haba no supera el 2%, mientras que en garbanzo y en altramuz puede alcanzar un 6% y un 10%, respectivamente. Las legumbres carecen de colesterol y son ricas en ácidos grasos monoinsaturados, como el ácido oleico, y poliinsaturados, como los ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico (Delgado-Andrade y col., 2016).

A continuación, se detallan algunos aspectos químicos, bioquímicos y de actividad biológica y mecanismos de acción de los compuestos de legumbres más relevantes por sus beneficios en la prevención y control del SMet. A lo largo de esta sección se han revisado con especial interés los estudios realizados en la lenteja, legumbre objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral.

#### **2.2.2.1. Carbohidratos**

Las legumbres son ricas en hidratos de carbono cuyo contenido medio ronda entre el 40-63% del peso seco en las principales legumbres de consumo habitual (**Tabla 4**). Los principales carbohidratos presentes en las legumbres son el almidón, la fibra, y los oligosacáridos, siendo el almidón el componente mayoritario (35-45% del peso seco de las semillas). El almidón está compuesto por fracciones de amilosa y amilopectina, cuya composición varía con el tipo legumbres. La composición del almidón es clave para ejercer sus efectos beneficiosos en la salud ya que determina su índice glucémico. El almidón de las legumbres es de digestión lenta, por tanto, ayuda a controlar los niveles de glucosa e insulina en sangre, especialmente el almidón resistente a la digestión que forma parte de la fibra. Este almidón también ayuda a mantener la homeostasis lipídica en sangre y, por tanto, es de especial interés su contribución en la prevención de enfermedades (Arnoldi y col., 2015; Delgado-Andrade y col., 2016; Trinidad y col., 2009).

**Tabla 4.** Contenido de los principales componentes nutritivos presentes en las legumbres de mayor consumo humano<sup>1</sup>.

Componentes	Judías			Lentejas	Garbanzos	Habas	Altramuz
	Negras	Blancas	Pintas				
Proteína (g)	21,6	22,33	21,42	24,63	20,47	26,12	36,17
Lípidos totales (g)	1,42	1,50	1,23	1,06	6,04	1,53	9,74
Carbohidratos totales (g)	62,36	60,75	62,55	63,35	62,95	58,29	40,37
Fibra total (g)	15,5	15,3	15,5	10,7	12,2	25,0	18,9
Azúcares totales (g)	2,12	3,88	2,11	2,03	10,70	5,70	-

<sup>1</sup> Datos obtenidos de la Base de Datos Nacional de Nutrientes del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos para 100 g de semilla cruda. Disponible en: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/nutrients/index>

El contenido en fibra alimentaria en las legumbres oscila entre un 10% y un 25% del peso seco (**Tabla 4**). La fibra soluble (con valores de hasta el 14% del peso seco) está compuesta por pectinas, gomas, y oligosacáridos (rafinosa, estaquiosa, verbascosa y fructanos). Esta fracción de la fibra se caracteriza por su capacidad de retención de agua lo que permite aumentar la viscosidad del contenido intestinal. La fracción insoluble de la fibra está formada por celulosa, hemicelulosa, lignina y almidón resistente que favorecen el tránsito intestinal. Numerosas evidencias sugieren que la ingesta de fibra está asociada con la disminución de los factores de riesgo del SMet ya que retrasa el vaciado gástrico y promueve la digestión lenta de carbohidratos, atenúa la absorción de azúcares y mejora la sensibilidad a la insulina postprandial contribuyendo a reducir los niveles de glucosa en sangre (Hosseinpour-Niazi y col., 2011; Reverri y col., 2017).

Por otro lado, la fibra de las legumbres mantiene el equilibrio de los niveles de lípidos plasmáticos. El almidón resistente y los oligosacáridos tienen propiedades de unión a ácidos biliares contribuyendo a la reducción de los niveles de lípidos en sangre (Micha y col., 2017; Pistollato y Battino, 2014). Además, estudios realizados en legumbres como lenteja, garbanzo, judía y guisante han demostrado que la fibra y el almidón resistente presentes en las semillas son capaces de unirse a los ácidos biliares y el colesterol durante la formación intraluminal de micelas, reduciendo el contenido de colesterol de los hepatocitos e inhibiendo la síntesis de ácidos grasos. Como resultado, se produce una disminución del C-LDL que ayuda a controlar la dislipemia postprandial (Hermsdorff y col., 2011; Trinidad y col., 2009). La fibra presente en las legumbres tiene efecto saciante, contribuyendo a la regulación de la ingesta calórica y al mantenimiento del peso corporal. Estudios realizados en judía han demostrado que la fibra

incrementa la concentración de los péptidos intestinales colecistoquinina K (CCK) y péptido tirosina tirosina (PYY<sub>3-36</sub>) que tienen efecto saciante y disminuyen la concentración de la hormona grelina que promueve la sensación de hambre (Nilsson y col., 2013; Reverri y col., 2017). Por otro lado, el almidón resistente y los oligosacáridos poseen actividad prebiótica al ser fermentados por la microbiota intestinal humana produciendo ácidos grasos de cadena corta en el intestino que incrementan la expresión de genes de PYY<sub>3-36</sub> y proglucagón. El proglucagón es el precursor de los péptidos intestinales similares a glucagón 1 y 2 considerados hormonas antidiabéticas y Saciantes ya que estimulan la producción de insulina y oxintomodulina (hormona supresora del apetito) (Nilsson y col., 2013).

### 2.2.2.2. Proteínas

Nutricionalmente las legumbres son la principal fuente de proteínas de origen vegetal, cuyo contenido representa entre el 20% y el 36% del peso seco. Así, por ejemplo, encontramos contenidos proteicos medios del 21% en judía, 24% en lenteja, 20% en garbanzo, 26% en haba y 36% en altramuz (**Tabla 4**). El perfil de aminoácidos de las legumbres se caracteriza por un bajo contenido en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y un elevado contenido en lisina y treonina (Delgado-Andrade y col., 2016). Además, contienen mayor cantidad de aminoácidos como arginina, ácido glutámico y aspártico que los cereales (Rizzello y col., 2015).

Las proteínas de la lenteja están formadas en un 16% de albúminas, un 70% de globulinas, un 11% de glutelinas y un 3% de prolaminas (Jarpa-Parra, 2018). Las albúminas, glutelinas y prolaminas tiene un peso molecular de 20, 17-46 y 16-64 kDa, respectivamente. Las globulinas de lenteja contienen proteínas tipo legumina y vicilina. El primer grupo consiste en pares de seis polipéptidos que interactúan no covalentemente y tienen un peso molecular de 320-380 kDa. Cada una de estas parejas de polipéptidos están compuestas por subunidades ácidas y básicas, unidas por enlaces disulfuro. Tradicionalmente este grupo se identifica como globulinas 11S, aunque más recientemente se ha reclasificado como globulinas 13S (Jarpa-Parra, 2018). El segundo grupo de globulinas es conocido como 7S y está compuesto por trímeros de subunidades glicosiladas con pesos moleculares que oscilan entre 50 y 60 kDa. Los puntos isoeléctricos de las proteínas de lenteja varían entre pH 3,0 y 5,9 y su solubilidad a pH > 7 se encuentra entre el 78% y el 91%.

Los beneficios de las proteínas de legumbres para la salud están respaldados por numerosos estudios que demuestran su actividad biológica. Sin embargo, los mecanismos moleculares que determinan su actividad aún no han sido completamente dilucidados. La evidencia científica acumulada hasta el momento apunta a que muchas propiedades

fisiológicas y funcionales de las proteínas de legumbres se atribuyen a la presencia de péptidos biológicamente activos que están encriptados en la secuencia nativa (Rizzello y col., 2015). Dichos péptidos pueden liberarse de la proteína precursora mediante hidrólisis química o enzimática durante la digestión gastrointestinal o el procesado de alimentos pudiendo ejercer su actividad biológica en el organismo (Padhi y Ramdath, 2017), como se pone de manifiesto en la **Tabla 5**.

Los péptidos bioactivos de legumbres están recibiendo especial atención por su **actividad antihipertensiva** mediante la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) (García-Mora y col., 2014, 2015a,b y 2017; Jakubczyk y Baraniak, 2014; Li y Aluko, 2010; Luna-Vital y col., 2015). La ECA cataliza la hidrólisis de angiotensina I en angiotensina II, un octapéptido con potente acción vasoconstrictora. Paralelamente, la ECA degrada el péptido bradiquinina, que es un importante vasodilatador. Como resultado, tiene lugar la contracción de los vasos sanguíneos y la elevación de la presión arterial.

Algunos péptidos derivados de proteínas de judía, lenteja, garbanzo y frijol alado (*Psophocarpus tetragonolobus* L.) ejercen **actividad antioxidante** (García-Mora y col., 2014, 2015a,b y 2017; Ghribi y col., 2015; Kou y col., 2013; Yea y col., 2014) al ser capaces de inhibir reacciones de oxidación mediante diferentes mecanismos de neutralización de radicales libres tales como la donación de protones o electrones así como la fijación a iones metálicos (Singh y col., 2014).

**Tabla 5.** Péptidos derivados de proteínas de legumbres y su actividad biológica.

Legumbre	Secuencia de aminoácidos	Actividad biológica	Referencia
	FVPH, SWN, FVPHYYSK, GHHH, FVPHYYSKAI	Antioxidante	
	NEGEAH, DNPIFSDHQ, SGSYFVDGHH	Antiinflamatoria	(García-Mora y col., 2015a)
	FVP, VNP, IPA, PNNPQIH, FFL, HIR, LEF, LVE, LLP, KE	Antihipertensiva (inhibidora de la ECA)	
Judía	LLSL, QQEG, FFL, NEGEAH, ALVLL, DKGGLL, LLL, LLLLED	Antidiabética (inhibidora de la enzima $\alpha$ -amilasa y estimuladora del metabolismo de la glucosa)	(Oseguera-Toledo y col., 2015 y 2016)
	GLTSK, LSGNK, GEGSGA, MPACGSS, MTEEY	Antihipertensiva (inhibidora de la ECA)	(Luna-Vital y col., 2015)
	KKSSG, CPGNK, GGGLHK, KTYGL	Antidiabética (inhibidora de $\alpha$ -glucosidasas)	(Mojica y col., 2015 y 2017)
Lenteja	RWL, VKV, LLPH, LLPHY, AY, YLV, IKL, LY, RW, SWN	Antioxidante	(García-Mora y col., 2014, 2015b y 2017)
	DLP, LRW, LRWLKL, VK, LLP, LLPHY, VF, AY, LF, IA, IAYL, RF, HIRL, LY, VRLY	Antihipertensiva (inhibidora de la ECA)	
Guisante	GGSGNY, DLKLP, GSSDNR, MRDLK, HNTPSR, IR, KF, EF	Antihipertensiva (inhibidora de la ECA)	(Jakubczyk y Baraniak, 2014; Li y Aluko, 2010)
Garbanzo	RQSHFANAQP, DHG, VGDI	Antioxidante	(Ghribi y col., 2015; Kou y col., 2013)
Frijol alado	FDIRA, YPNQKV	Antioxidante	(Yea y col., 2014)

ECA: enzima convertidora de angiotensina-I

Se han identificado también péptidos derivados de proteínas de legumbres con **actividad antidiabética**. Las enzimas digestivas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa catalizan la ruptura de almidón, oligosacáridos y disacáridos a glucosa permitiendo su absorción en el intestino y aumentando los niveles de glucosa en sangre durante el periodo postprandial (Lee y col., 2016; Oseguera-Toledo y col., 2015). Estudios recientes realizados en judía han demostrado la presencia de péptidos capaces de inhibir la actividad de estas enzimas, produciendo un efecto hipoglucémico que podría ayudar a prevenir y controlar la DMT2 (Mojica y col., 2015, 2017;

Oseguera-Toledo y col., 2015). Otros estudios *in vitro* han confirmado que el efecto hipoglucémico de los péptidos de judía liberados durante la digestión se debe a la inhibición de la dipeptidil peptidasa IV, la estimulación de la secreción de insulina en las células pancreáticas y la mejora de la señalización de la insulina en las células del tejido adiposo (Oseguera Toledo y col., 2016).

Una de las propiedades beneficiosas más estudiadas de los péptidos bioactivos de legumbres es su **actividad hipolipémica**. Hasta ahora, los datos publicados ofrecen varios mecanismos de acción que explican el efecto hipolipémico de los péptidos de legumbres, incluyendo la modulación de la expresión génica implicada en el metabolismo de lípidos en hepatocitos y adipocitos (Howard y Udenigwe, 2013; Lammi y col., 2016). Dicha regulación está relacionada con la sobreexpresión del receptor de LDL, enzimas del metabolismo de colesterol y la oxidación de ácidos grasos, así como la represión de la expresión de proteínas implicadas en la lipogénesis y la síntesis de ácidos biliares.

Así mismo, los péptidos derivados de legumbres pueden ejercer un **efecto saciante** a través de la activación de receptores de hormonas que regulan la ingesta de alimentos como la CCK y la leptina (Jang y col., 2008; Staljanssens y col., 2012) o bien mediante la estimulación de su secreción (Nishi y col., 2003).

Hidrolizados de judía son capaces de **inhibir la respuesta inflamatoria** inducida en macrófagos por lipopolisacárido (LPS) bacteriano mediante la inhibición de la activación del factor de transcripción  $\kappa\beta$  (NF $\kappa\beta$ ) y la expresión de enzimas implicadas en la síntesis de eicosanoides y ERO (ciclooxigenasa 2 y óxido nítrico sintasa inducible, respectivamente) (García-Mora y col., 2015b; Oseguera-Toledo y col., 2011).

Aunque el número de estudios que demuestran el efecto beneficioso para la salud de los péptidos derivados de proteínas de legumbres es cada vez mayor, son muy pocos los realizados en la lenteja. Hasta el momento se conoce que la hidrólisis enzimática y DGI de proteínas de lenteja libera péptidos multifuncionales con actividad antihipertensiva y antioxidante *in vitro* (García-Mora y col., 2017). Sin embargo, su potencial para ejercer otras funciones fisiológicas está aún por explorar. El análisis predictivo del potencial de la convicilina de lenteja utilizando la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia>) demuestra que dicha proteína es una fuente de péptidos bioactivos con acciones: i) inhibidora de la ECA, la dipeptidil-aminopeptidasa IV, la fosfodiesterasa de nucleótidos dependiente de calmodulina y la renina; ii) estimuladora de la liberación de sustancias vasoactivas y de la captación de glucosa; iii) antioxidante y iv) reguladora de la secreción de mucosa gástrica. La presencia de

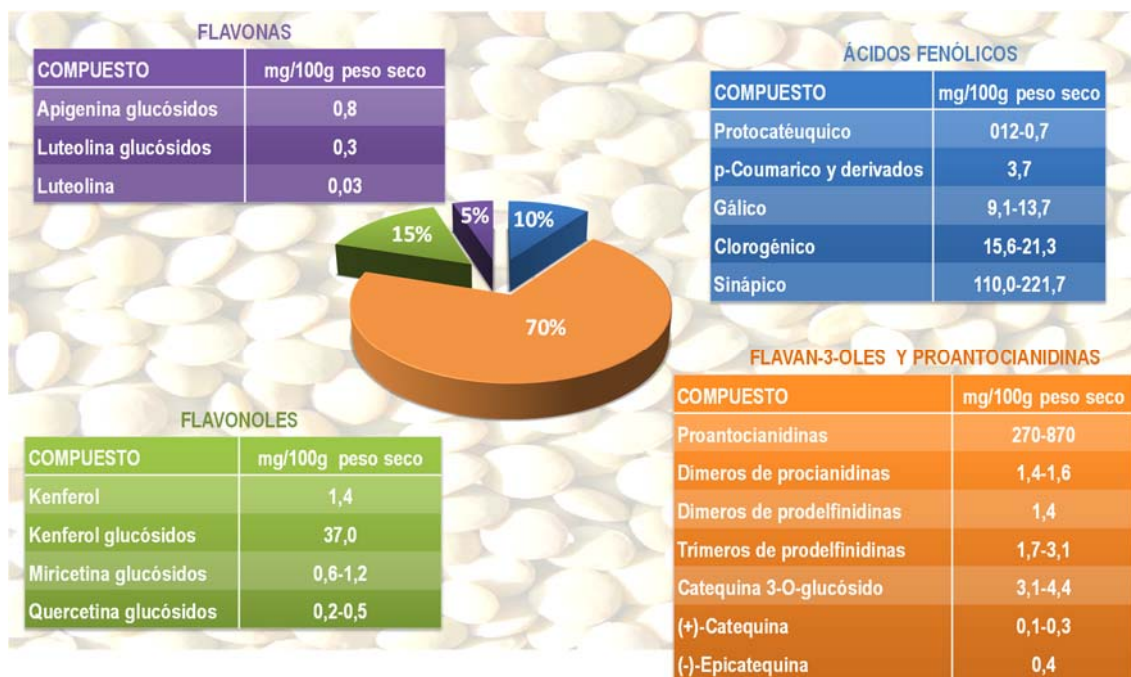
estas secuencias de péptidos bioactivos en las proteínas de lenteja aporta una base firme que sugiere el estudio de su potencial en la producción de ingredientes multifuncionales para la prevención y control del SMet.

### 2.2.2.3. Compuestos fenólicos

Las legumbres son, además, fuente importante de compuestos fenólicos, metabolitos secundarios de las plantas con estructuras químicas que cuentan con, al menos, un grupo fenol en su molécula. El análisis de la composición fenólica se realiza empleando diversas técnicas analíticas. El ensayo colorimétrico Folin-Ciocalteu es la técnica más rápida y ampliamente extendida en la bibliografía para la determinación del contenido total de compuestos fenólicos polares presentes en los alimentos. Sin embargo, para una determinación más exacta e individual de compuestos se emplea la cromatografía líquida acoplada a espectrometría visible/UV o espectrometría de masas (MS/MS, QTof) (Briante y col., 2002). La espectrometría de masas se considera una herramienta muy eficaz para completar la caracterización fenólica y aportar más información de forma selectiva y con alta resolución sobre compuestos relacionados estructuralmente.

Los compuestos fenólicos mayoritarios presentes en las legumbres son los ácidos fenólicos, flavonoides y procianidinas (Giusti y col., 2017). La lenteja posee el contenido más alto de compuestos fenólicos totales en comparación con otras legumbres (Xu y Chang, 2007) y su perfil fenólico se representa en la **Figura 4**.

La lenteja destaca por su elevado contenido en flavonoides (221 mg equivalentes de catequina /100 g) y taninos condensados (proantocianidinas) (810 mg equivalentes de catequina/100 g) (Faris y col., 2013).



**Figura 4.** Composición fenólica de la lenteja.

El grupo mayoritario de compuestos fenólicos en la lenteja corresponde a los flavan-3-oles que constituyen un 70% de los compuestos fenólicos totales (Aguilera y col., 2010; Martín-Cabrejas y col., 2009). Dentro de este grupo, en la lenteja se han identificado monómeros de (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina y (+)-galocatequina, siendo la (+)-catequina-3-O-glucósido el compuesto más abundante.

También se ha descrito la presencia de proantocianidinas con configuración tipo B con subunidades de tipo (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina y (+)-galocatequina que llegan a alcanzar concentraciones entre 270 y 870 mg/100 g (Ozga y col., 2012). Las proantocianidinas más abundantes en las lentejas son polímeros (65-75%) con un grado de polimerización medio de 7-9 subunidades, seguido por oligómeros (20-30%) con un grado de polimerización medio de 4-5 subunidades (Dueñas y col., 2003).

Los flavonoles representan el 17% del contenido total de fenoles en la lenteja siendo los glucósidos de kenferol los más abundantes (Zou y col., 2011). La lenteja también contiene glucósidos de quercetina y miricetina como la miricetina 3-O-ramnósido y la quercetina 3-O-rutinósido (Zou y col., 2011). Adicionalmente, esta legumbre presenta flavonas y flavanonas glicosiladas como la apigenina 7-O-aposil-glucósido y la luteolina diglucósido que constituyen sólo el 5% del contenido total de fenoles (Dueñas y col., 2002). El contenido e identificación de antocianinas en lenteja no ha sido muy estudiado hasta la fecha. Sólo un estudio llevado a cabo en la lenteja negra identificó la delfinidina 3-O-(2-O-β-D-glucopiranosil-α-L-

arabinopiranosido) como la principal antocianina en esta semilla (Takeoka y col., 2005). El contenido de antocianinas está relacionado con el color de la testa y, por tanto, varía mucho en las distintas variedades de lenteja oscilando entre 15,7-66,6 mg/100 g (Xu y Chang, 2010). En lenteja también se han identificado lignanos como el cumesterol, matairesinol y secoisolariciresinol, siendo este último el más abundante (Konar, 2013).

Dentro del grupo de los ácidos fenólicos, los más abundantes en la lenteja son los ácidos gálico, clorogénico y sinápico (Aguilera y col., 2010; Xu y Chang, 2010). Este grupo de compuestos es minoritario y representa tan sólo el 10% del total de compuestos fenólicos en esta legumbre.

Estudios *in vitro* e *in vivo* en modelos animales de SMet han mostrado que los compuestos fenólicos de legumbres mejoran el metabolismo lipídico, estimulan la oxidación de lípidos e inhiben su acumulación en el tejido adiposo visceral (Kitano-Okada y col., 2012; Prakash y Gupta, 2011). Además, reducen la inflamación asociada a la obesidad, aumentando la liberación de adiponectina y reduciendo la producción de TNF- $\alpha$  en el tejido adiposo visceral. Estudios en humanos confirman estos resultados e indican que el consumo de polifenoles disminuye significativamente la circunferencia abdominal (CC), la presión arterial sistólica (PAS) y la concentración plasmática postprandial de TG, a la vez que aumenta el C-HDL (Egert y col., 2010; Pfeuffer y col., 2013; Yao y col., 2011).

Existen varios mecanismos implicados en el efecto positivo de los compuestos fenólicos sobre la disminución de los factores de riesgo asociados al SMet. Los compuestos fenólicos de legumbres contribuyen a reducir el riesgo de DMT2 por su **efecto hipoglucémico** mediante la inhibición de enzimas implicadas en la digestión de carbohidratos que incluyen la  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasas intestinales (Tan y col., 2017). También se han encontrado flavonoides como las antocianidinas, capaces de inhibir las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasas reduciendo los niveles de glucosa postprandial (Reverri y col., 2015). Las evidencias sobre el papel de los compuestos fenólicos en la prevención o reversión de la resistencia a la insulina son todavía muy incipientes y sugieren mecanismos como la estimulación de la expresión de proteínas implicadas en las rutas de señalización de la insulina en el músculo esquelético, hígado (Cordero-Herrera y col., 2013; Meepprom y col., 2011) y tejido adiposo (Tzeng y col., 2009).

Los polifenoles ejercen una **acción antioxidante** directa neutralizando especies reactivas de oxígeno (ERO) (Aguilera y col., 2010). Además, los compuestos fenólicos pueden activar la respuesta antioxidante celular, y consecuentemente, la expresión de enzimas

antioxidantes como la superóxido dismutasa 1 (SOD-1), la catalasa o la glutatión peroxidasa entre otras (Spanou y col., 2012).

Ciertos estudios también demuestran el **efecto antihipertensivo** de los compuestos fenólicos al asociarse con la mejora de la función endotelial y el aumento de la biodisponibilidad del óxido nítrico (ON), disminuyendo la presión arterial. Estos efectos pueden ocurrir por varios mecanismos i) aumento de la actividad y expresión de la de óxido nítrico sintetasa endotelial y ii) inhibición de la nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (Yao y col., 2012).

Otra de las propiedades beneficiosas más estudiadas de los compuestos fenólicos es su **efecto hipolipémico**. Estos compuestos pueden disminuir la absorción de lípidos a nivel gastrointestinal inhibiendo la lipasa pancreática. Adicionalmente, pueden modular la actividad de diferentes enzimas implicadas en el metabolismo lipídico [sintetasa de ácidos grasos (FAS), proteína de transferencia de TG microsomal, acetil-CoA carboxilasa, aciltransferasa de digliceridos 2, etc] y la expresión de factores de transcripción implicados en la síntesis de colesterol y TG, por ejemplo, las proteínas de unión al elemento regulador de esteroides 1 y 2 (Quesada y col., 2009).

Los compuestos fenólicos presentes en las legumbres también han demostrado tener **efecto antiinflamatorio**. En particular, los flavonoides y taninos condensados ofrecen una protección indirecta frente al estrés oxidativo y los procesos inflamatorios mediante la activación de sistemas endógenos de defensa y modulación de procesos de señalización celular y produciendo un efecto antiinflamatorio por intervención de las rutas involucradas en la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  (Padhi y Ramdath, 2017; Singh y col., 2017; Tan y col., 2017). Un estudio reciente realizado por Zhang y col. (2017a) en extractos acuosos de lenteja mostró que flavonoles como kenferol, quercetina y sus derivados son compuestos con potencial antiinflamatorio capaces de inhibir la expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias *in vivo*. Además, estos compuestos son capaces de obstaculizar la producción de ON inducida por LPS bacteriano en macrófagos RAW 264.7, disminuyendo así la respuesta inflamatoria (Devi y col., 2015). Estudios realizados en quinchoncho (*Cajanus cajan* L.) encontraron resultados similares, ya que observaron que la antocianina cianidin-3-O-glucósido suprimió la producción de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en cultivos celulares de este mismo tipo de macrófagos (Lai y col., 2012).

Los mecanismos que explican la **acción antiobesidad** de los compuestos fenólicos se basan en la reducción de los niveles de lípidos mediante la inhibición de la actividad lipasa

pancreática (Kawaguchi y col., 1997; Rains y col., 2011). Su función es hidrolizar los TG dando lugar a ácidos grasos y glicerol (Buchholz y Melzig, 2015). Por tanto, la inhibición de la lipasa pancreática es uno de los mecanismos más estudiados como estrategia para reducir de forma efectiva la absorción de grasas de la dieta y, con ello, controlar la obesidad e hiperlipemia (Orqueda y col., 2017; Zhang y col., 2015). Estudios realizados en lenteja y judía han demostrado que los flavonoides de estas legumbres son capaces de inhibir la actividad de esta enzima (Tan y Chang, 2017; Tan y col., 2017; Zhang y col., 2015). Por otro lado, los compuestos fenólicos pueden promover la lipólisis en el hígado y músculo esquelético estimulando la expresión del receptor activado por proliferadores peroxisómicos tipo  $\alpha$ , los receptores de adiponectina 1 y 2 y la enzima carnitina palmitoiltransferasa-1 y, paralelamente, disminuir la expresión de enzimas implicadas en la lipogénesis (FAS y 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa) (Peng y col., 2011).

### **2.3. PRODUCCIÓN Y EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN ALIMENTOS MEDIANTE FERMENTACIÓN**

#### **2.3.1. Aspectos generales**

En los últimos años, los compuestos bioactivos de los alimentos están recibiendo una especial atención debido a sus efectos beneficiosos relacionados con la reducción de la incidencia de algunas enfermedades como la DMT2, las enfermedades cardiovasculares y la obesidad, patologías implicadas en el SMet. Debido a sus innumerables efectos beneficiosos para la salud, las investigaciones dirigidas a producir o aislar los compuestos bioactivos de distintas fuentes de alimentos para su aplicación como nutracéuticos o ingredientes funcionales se ha intensificado en los últimos años.

Los compuestos bioactivos son habitualmente recuperados de distintos alimentos o residuos agroindustriales mediante varias técnicas entre las que se incluyen la extracción sólido-líquido empleando solventes orgánicos en sistemas de calentamiento-reflujo (Martins y col., 2010). Más recientemente, se han utilizado otras técnicas más efectivas como los fluidos supercríticos, los procesos de alta presión, extracción asistida por microondas o campos eléctricos pulsados de alta intensidad (Belwal y col., 2018; Da Silva y col., 2016).

La extracción y producción de los compuestos bioactivos por fermentación es una alternativa muy interesante que merece especial atención, ya que es capaz de aportar una elevada calidad y actividad biológica a la vez que excluye cualquier toxicidad asociada a la utilización de disolventes orgánicos. Los microorganismos responsables del proceso fermentativo producen metabolitos secundarios bioactivos (Singh nee' Nigam, 2009). Los

estudios en fermentación líquida muestran que la producción de estos compuestos empieza cuando el crecimiento microbiano está limitado por el agotamiento de cualquiera de los nutrientes: carbono, nitrógeno o fosfato (Barrios-Gonzalez y col., 2005).

Los procesos de fermentación pueden ser divididos en: i) fermentación líquida o sumergida, basada en el cultivo de microorganismos en un medio líquido que contiene nutrientes, y ii) fermentación sólida, que consiste en el crecimiento microbiano y la formación de productos sobre partículas sólidas que contienen la suficiente humedad para permitir el crecimiento microbiano. Las ventajas de este último sistema con respecto al primero son la reducción de los costes de operación (menor gasto en agua y reducción del tamaño del fermentador, agitación, esterilización y procesos post-fermentativos). La principal desventaja de la fermentación sólida frente a la líquida es el escalado del proceso, debido a los problemas para mantener la homogeneidad del cultivo y la transferencia de calor (Di Luccio y col., 2004).

El desarrollo de un bioproceso de fermentación líquida eficiente para la producción del compuesto bioactivo deseado requiere la consideración de varios factores. El más importante de todos ellos es la elección de la cepa microbiana que se va a emplear como cultivo iniciador. La elección del microorganismo a utilizar depende fundamentalmente del producto final deseado. Los hongos filamentosos tienen un gran potencial en las fermentaciones sólidas por su capacidad de producir enzimas con actividad amilasa, pectinasa, xilanasas, celulasas, quitinasas, proteasa, lipasa y  $\beta$ -galactosidasa, entre otras (Martins y col., 2011). Por otro lado, las bacterias ácido-lácticas (BAL) han sido ampliamente utilizadas en los sistemas de fermentación líquida por sus actividades proteasa, peptidasa, amilasa, lactato deshidrogenasa, esterasa,  $\beta$ -glucosidasa, tanasa y celulasas, entre otras. Las BAL más comúnmente utilizadas en los procesos fermentativos pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Chandra-Hioe y col., 2016).

La correcta elección del sustrato es también importante para una producción económica y eficiente del compuesto de interés. En la mayoría de los casos el rendimiento de los metabolitos secundarios puede mejorarse con la adecuada selección del sustrato o mezcla de sustratos con los nutrientes apropiados. Algunos residuos agroindustriales como la pulpa y cáscara de café, bagazos de caña de azúcar y ágave, pulpa y cáscara de frutas han sido utilizados para la producción de compuestos bioactivos mediante fermentación sólida (Singh y Nigam y Pandey, 2009).

En los últimos años, las legumbres están recibiendo una especial atención como sustrato para la producción de compuestos bioactivos tanto en sistemas de fermentación

líquida como sólida (Jakubczyk y col., 2017; Limón y col., 2015; Torino y col., 2013). Hasta el momento, las legumbres se han utilizado principalmente para la producción de péptidos bioactivos, ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) y compuestos fenólicos solubles debido a su riqueza en proteínas, ácido glutámico (precursor de GABA) y compuestos fenólicos en su mayoría no extraíbles.

Son muchas las variables que pueden influir en el rendimiento del proceso de fermentación, desde el pretratamiento y tamaño de partícula de los sustratos hasta la densidad del inóculo, la temperatura, agitación, humedad (en fermentación sólida) o proporción sustrato-líquido (en fermentación sumergida) (Gamboa-Gómez y col., 2016; Landete y col., 2015; Zhang y col., 2017b). El pH es también una variable importante que influye en la extracción de los compuestos de interés y en la actividad de las enzimas microbianas. Por último, el tiempo de fermentación es también una variable crucial ya que los metabolitos deben difundir desde el sustrato sólido al medio líquido y, por tanto, pueden requerirse tiempos largos de fermentación.

El establecimiento de las condiciones óptimas de fermentación es de gran relevancia para alcanzar un rendimiento elevado en la producción de compuestos bioactivos. La utilización de una metodología estadística para el diseño de experimentos y optimización de las condiciones de fermentación constituye una herramienta de gran utilidad para definir tales condiciones y reducir al mínimo el número de experimentos a realizar.

### **2.3.2. Utilización de la fermentación para la producción de péptidos bioactivos**

Durante la fermentación pueden liberarse péptidos bioactivos a partir de las proteínas del sustrato por acción de los sistemas proteolíticos microbianos. La mayoría de los estudios realizados en este campo han empleado BAL. En términos generales, el sistema proteolítico de las BAL está compuesto por un número importante de enzimas que podemos clasificar en: i) proteinasas asociadas a la pared celular; ii) sistemas de transporte de oligo-, di y tri péptidos y iii) endopeptidasas y aminopeptidasas intracelulares (Hafeez y col., 2014).

Las rutas bioquímicas de formación de péptidos bioactivos están aún por identificar. El mecanismo de producción de los péptidos antihipertensivos VPP e IPP durante la fermentación de leche por *L. helveticus* ha sido el más estudiado hasta el momento. En este caso, la  $\beta$ -caseína es hidrolizada por la proteinasa asociada a la pared celular de *L. helveticus* formándose oligopéptidos que son transportados por la permeasa OppC al interior de la célula donde vuelven a hidrolizarse por la endopeptidasa PepO2 y las aminopeptidasas PepN y PepE produciéndose, finalmente, los péptidos VPP e IPP (Chen y col., 2014).

El sistema proteolítico de las BAL varía en función de la especie e, incluso, de la cepa. Por ejemplo, algunos estudios demuestran que las peptidasas predominan en el sistema proteolítico de *L. helveticus* mientras que las proteinasas asociadas a la pared celular predominan en *B. bifidum* (Gonzalez-Gonzalez y col., 2013). En este sentido, *B. bifidum* MF 20/5 es capaz de producir péptidos antioxidantes (VLPVPQK) y antihipertensivos (LVYPPF) de mayor peso molecular a partir de caseína, mientras que *L. helveticus* DSM13137 genera menor cantidad de péptidos antihipertensivos (IPP and VPP) y mayor de aminoácidos. Por ello, la selección del microorganismo a emplear en el proceso de fermentación es crucial para que la producción de péptidos bioactivos sea eficiente. En este sentido, *L. acidophilus* ha sido seleccionado como cultivo iniciador en la fermentación de bebida de soja para la producción de péptidos antihipertensivos. Otro estudio mostró que el empleo de *L. rhamnosus* NCDC24, *L. casei* subsp. *casei* NCDC17 y *L. paracasei* subsp. *paracasei* NCDC63 permite maximizar la producción de péptidos antioxidantes en leche fermentada (Ramesh y col., 2012). Cuando se trata de producir péptidos antihipertensivos y fijadores de calcio durante la elaboración de queso fresco se recomienda la utilización de cepas de *L. helveticus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *L. casei* como cultivos microbianos adjuntos (Dimitrov y col., 2015). La utilización de distintas combinaciones de BAL autóctonas aisladas de cereales y legumbres (*L. alimentarius* 15M, *L. brevis* 14G, *L. sanfranciscensis* 7A y *L. hilgardii* 51B, entre otras) permite la liberación de péptidos antioxidantes y antihipertensivos (Coda y col., 2012).

En los últimos años, se han utilizado aproximaciones basadas en la genómica comparativa para predecir el potencial proteolítico de las BAL y seleccionar aquellas cepas capaces de liberar péptidos bioactivos a partir de las proteínas alimentarias. El estudio llevado a cabo por Liu y col. (2010) describe que *L. helveticus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* poseen un amplio espectro de genes que codifican enzimas proteolíticas que incluyen proteinasas de la pared celular, endopeptidasas (PepO, PepF, and PepG), prolinpeptidasas (PepX, PepI, PepR, PepP, and PepQ), tripeptidasas (PepT), dipeptidasas (PepD y PepV) y aminopeptidasas (PepC, PepN, PepM, PepA y Pcp) en comparación con las BAL presentes naturalmente en los alimentos de origen vegetal, tales como *L. plantarum*, *O. oeni*, y *L. mesenteroides* que se caracterizan por carecer de proteinasas extracelulares (Gänzle, 2014). Por tanto, cuando se parte de sustratos vegetales como en el caso de las legumbres, cereales y pseudocereales es necesario desarrollar nuevas estrategias para mejorar los rendimientos en la producción de péptidos bioactivos mediante fermentación con estas especies bacterianas. En este sentido, el empleo de cocultivos (Coda y col., 2012; Rizzello y col., 2008, 2015, 2016), la adición de proteasas comerciales o la utilización de enzimas de granos germinados (Gänzle, 2014) como

coadyuvantes en la hidrólisis de proteínas y liberación de péptidos podría mejorar la eficiencia del proceso de fermentación. Por último, los parámetros que influyen en la hidrólisis de proteínas (principalmente el pH y tiempo) deben ser optimizados para cada sustrato proteico y actividad del conjunto de enzimas y deben ser mantenidos durante todo el proceso de fermentación para asegurar la eficiente liberación de péptidos. La actividad microbiana disminuye el pH del medio hasta valores de 3,5-4,0, frenando la actividad proteolítica de las enzimas microbianas, endógenas (del sustrato) o comerciales y reduciendo la solubilidad de las proteínas del sustrato, lo que las hace menos susceptibles para su degradación (Gänzle, 2014). En este sentido, el control del pH durante la fermentación podría ser utilizado como estrategia para la mejora de la producción de péptidos. La duración del proceso de fermentación está relacionada inversamente con el tamaño de los péptidos que se generan, aunque en la mayoría de los casos se alcanza un plateau a partir del cual no se produce ningún efecto en la actividad de los péptidos (Aluko, 2015).

Con todo lo expuesto, hay que destacar que la acción combinada de enzimas proteolíticas comerciales de grado alimentario y procesos fermentativos con BAL se identifica como una estrategia viable para incrementar el contenido en péptidos bioactivos en las fermentaciones de sustratos vegetales logrando, además, diversificar las actividades biológicas del producto final (De Castro y Sato, 2015; Hafeez y col., 2014).

### **2.3.3. Utilización de la fermentación para la producción de compuestos fenólicos**

La mayor parte de los compuestos fenólicos en vegetales no pueden ser extraídos fácilmente utilizando procesos de extracción convencionales ya que en muchas matrices alimentarias la mayoría de estos compuestos se encuentran unidos a los componentes de la pared celular a través de enlaces covalentes de tipo éster, éter o glucosídicos. La liberación completa de los compuestos fenólicos es posible mediante hidrólisis química (ácida o alcalina) o enzimática. La hidrólisis química presenta ciertas limitaciones ya que se ha descrito la degradación de ácidos derivados de los ácidos cinámico, *p*-cumárico, cafeico y ferúlico tras este tipo de hidrólisis (Robbins, 2003). La extracción enzimática de compuestos fenólicos representa una alternativa más sostenible y segura, sin embargo, no es rentable ya que requiere la utilización de un cocktail de enzimas comerciales (amilasas, celulasas, xilanasas, esterases, etc). En contraposición, la fermentación presenta una ventaja significativa frente a las hidrólisis química y enzimática por su rentabilidad y sostenibilidad. Durante los procesos de fermentación se producen enzimas microbianas extracelulares implicadas en la extracción/liberación de compuestos fenólicos de la matriz del sustrato junto con la síntesis de

nuevos compuestos fenólicos mediante el metabolismo secundario de los microorganismos fermentativos (Gan y col., 2016).

Las enzimas microbianas (proteasas, glucosidasas, amilasas, celulasas, quitinasas, inulasas, fitasas, xilanasas, tanasas, esterases, invertasas o lipasas) producidas durante la fermentación pueden desintegrar los componentes macromoleculares de la matriz del alimento e hidrolizar glucósidos fenólicos facilitando su liberación y posterior extracción. Por otro lado, las BAL pueden contribuir a la despolimerización de compuestos fenólicos de alto peso molecular (Othman y col., 2009) y a su metabolismo mediante la acción de diferentes rutas enzimáticas. *L. plantarum* es el microorganismo más utilizado en las fermentaciones de alimentos vegetales donde los compuestos fenólicos son abundantes. Se ha descrito la capacidad de *L. plantarum* para metabolizar ácidos hidroxibenzoicos, taninos y ácidos hidroxicinámicos a través de diferentes rutas en las que participan varias enzimas con actividades esterasa, decarboxilasa y reductasa (Muñoz y col., 2016). En la **Tabla 6** se muestran las distintas rutas metabólicas de transformación de compuestos fenólicos identificadas en *L. plantarum*.

**Tabla 6.** Rutas metabólicas de transformación de ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos identificadas en *L. plantarum*.

<b>Rutas metabólicas de ácidos hidroxibenzoicos</b>						
<u>Compuesto 1</u>	<u>Enzima 1</u>	<u>Compuesto 2</u>	<u>Enzima 2</u>	<u>Compuesto 3</u>		
Galoil ester	Esterasa	Ácido gálico	Descarboxilasa	Pirogalol		
Protocatecuoil ester	Esterasa	Ácido protocatecuico	Descarboxilasa	Catecol		
<b>Rutas metabólicas de ácidos hidroxicinámicos</b>						
<u>Compuesto 1</u>	<u>Enzima 1</u>	<u>Compuesto 2</u>	<u>Enzima 2</u>	<u>Compuesto 3</u>	<u>Enzima 3</u>	<u>Compuesto 4</u>
<i>p</i> -Cumaroil ésteres	Esterasa	Ácido <i>p</i> -Cumárico	Descarboxilasa reductasa	Vinil fenol Ácido florético	Reductasa	Etilfenol
Feruloil ésteres	Esterasa	Ácido ferúlico	Descarboxilasa reductasa	Vinil guaiacol Ácido hidroferúlico	Reductasa	Etil guaiacol
Cafeoil ésteres	Esterasa	Ácido cafeico	Descarboxilasa reductasa	Vinil catecol Ácido hidrocafeico	Reductasa	Etil catecol
Sinapil ésteres	Esterasa	Ácido sinápico				
<i>m</i> -Ácido Cumárico	Reductasa	3-(3-ácido hidroxifenil propiónico)				

*L. plantarum* ha sido utilizado en la fermentación de legumbres para facilitar la extracción/liberación y bioconversión de los compuestos fenólicos, obteniéndose así mejoras en la actividad biológica del producto final. Las isoflavonas se encuentran comúnmente en las legumbres como glucósidos de daizdeína y genisteína que son biológicamente inactivos en comparación con su respectivas agliconas. Varios estudios han demostrado que la fermentación con *L. plantarum* disminuye la proporción de isoflavonas glucósidos/aglicona durante la producción de bebidas de legumbres fermentadas como el caupí y judía mungo (Dueñas y col., 2004; Landete y col., 2015). La transformación de isoflavonas durante la fermentación de legumbres con *L. plantarum* se atribuye a la enzima  $\beta$ -glucosidasa que cataliza la hidrólisis de glucósidos de isoflavonas (daizdina y genistina) a sus correspondientes agliconas. En esta misma línea, se ha demostrado que la fermentación de judía pinta y lenteja con *L. plantarum* aumenta la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos totales mejorando la actividad antioxidante y antihipertensiva del producto final (Limón y col., 2015; Torino y col., 2013).

## **2.4. INFLUENCIA DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL EN LA BIOACCESIBILIDAD Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS**

### **2.4.1. Aspectos generales**

La DGI es un proceso que tiene como fin proporcionar los nutrientes necesarios al organismo para el crecimiento, reparación celular y utilización como fuente de energía. Los cambios que se producen como consecuencia de la DGI de los alimentos van a determinar su valor nutricional y sus posibles efectos saludables. El conocimiento de los cambios fisicoquímicos y bioquímicos que ocurren en los alimentos durante el proceso de digestión y los diversos factores que influyen en la bioaccesibilidad, biodisponibilidad y digestibilidad de nutrientes (Fernández-García y col., 2012; Hedrén y col., 2002) es de gran utilidad para diseñar alimentos funcionales. Profundizar en dicho conocimiento permitirá establecer recomendaciones diarias de ingesta de nutrientes y conocer las condiciones de procesado que maximicen los efectos en la salud de los compuestos bioactivos (Manach y col., 2005; Sengul y col., 2014).

Recientemente, ha aumentado de forma exponencial el número de investigaciones dedicadas a demostrar la eficacia de nuevos ingredientes o alimentos funcionales mediante el estudio de la influencia de la DGI en la actividad biológica de los compuestos bioactivos presentes. Los resultados de dichas investigaciones varían dependiendo de los modelos de digestión utilizados. Los métodos *in vivo* producen resultados más relevantes y precisos, sin embargo, son técnicamente costosos, complicados de desarrollar y limitados por cuestiones

éticas (Augustin y col., 2014). Estas limitaciones han propiciado la utilización de métodos *in vitro* consensuados como el método de digestión estática desarrollado por Minekus y col. (2014), que simula las condiciones fisiológicas en las fases oral, gástrica e intestinal de la digestión, tomando en consideración varios factores como la presencia y concentración de enzimas digestivas, los valores de pH en las fases gástrica e intestinal, el tiempo de digestión y las concentraciones de sales, entre otros factores.

#### **2.4.2. Péptidos bioactivos**

Después de su administración oral, los péptidos pueden encontrar barreras químicas, bioquímicas y físicas que pueden modificar su actividad biológica. La hidrólisis de péptidos comienza en el estómago, cuyo pH ácido permite la activación de la pepsina, que actúa hidrolizando enlaces peptídicos de naturaleza hidrofóbica contribuyendo a la degradación proteica. La hidrólisis de péptidos continúa en el intestino delgado debido a la acción de enzimas secretadas en los jugos pancreáticos (tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas A y B, elastasa) y a las peptidasas del borde en cepillo del epitelio intestinal (aminopeptidasas, carboxipeptidasas y dipeptidasas). Existen al menos 20 peptidasas dispuestas en la membrana luminal de las células epiteliales. Estas enzimas tienen un efecto específico sobre los enlaces peptídicos y liberan aminoácidos libres que pueden penetrar en las células epiteliales a través de transportadores secundarios de sodio activo, por lo tanto, hay 20 tipos de transportadores de aminoácidos.

Algunos péptidos bioactivos son capaces de resistir la acción de las proteasas, hecho que está relacionado con su estructura. Por ejemplo, los péptidos que incluyen prolina o hidroxiprolina y dipéptidos u oligopéptidos con prolina en el extremo C-terminal no son hidrolizados por las enzimas digestivas. Éste es el caso de los lactotripéptidos antihipertensivos IPP y VPP (Boelsma y Kloek, 2008). Por otro lado, los péptidos se pueden hidrolizar durante la DGI y aumentar su actividad. Como ejemplo, diferentes secuencias antihipertensivas y antioxidantes derivadas de las proteínas de lenteja mostraron una actividad mayor al perder varios residuos después de la digestión gastrointestinal *in vitro* (García-Mora y col., 2017).

Los péptidos se pueden transportar activa o pasivamente dependiendo de su peso molecular y composición de aminoácidos. Los péptidos compuestos por dos o tres aminoácidos son absorbibles a través del transporte activo basado en el gradiente de iones hidrógeno o el transportador PepT1. Por ejemplo, péptidos antihipertensivos como IF, AF, IPP y VPP permanecen estructuralmente estables durante la infiltración a través del epitelio y la eficacia del transporte depende de la carga, el peso molecular e hidrofobicidad (Sienkiewicz-

Szłapka y col., 2009). En las células epiteliales, los aminoácidos pueden hidrolizarse por peptidasas intracelulares y llegar al torrente sanguíneo por difusión a través de las membranas basolaterales. Por otro lado, la transcitosis y la vía paracelular se han sugerido como mecanismos de absorción de péptidos de mayor peso molecular (Shimizu y col., 1997). Por ello, es necesario conocer la influencia de la DGI sobre los péptidos bioactivos y conocer su potencial multifuncional frente al SMet.

### **2.4.3. Compuestos fenólicos**

El estudio del proceso digestivo de los compuestos fenólicos es esencial para conocer su biodisponibilidad y confirmar su actividad biológica. La bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos a partir de matrices sólidas también debe tenerse en cuenta ya que solo aquellos liberados de la matriz alimentaria y/o absorbidos en el intestino delgado son potencialmente biodisponibles y pueden ejercer sus efectos beneficiosos (Tagliazucchi y col., 2010, 2011). La estabilidad de los compuestos fenólicos durante la DGI depende de su estructura y del tipo de matriz alimentaria. Aunque la susceptibilidad de los compuestos fenólicos a la degradación aumenta después de su liberación de la matriz alimentaria, otras interacciones con la fibra y las proteínas pueden afectar a su absorción y actividad biológica (Alminger y col., 2014).

Varios estudios han demostrado que las interacciones moleculares entre la fibra y los compuestos fenólicos afectan negativamente a su bioaccesibilidad (Alminger y col., 2014; Bouayed y col., 2011; Palafox-Carlos y col., 2011) ya que apenas son solubles en los fluidos gastrointestinales, hecho que limita su absorción. La interacción entre fibra y compuestos fenólicos, además, puede disminuir la actividad antioxidante de estos compuestos, ya sea debido a una menor cantidad de grupos hidroxilo disponibles para estabilizar los radicales libres (Palafox-Carlos y col., 2011) o bien debido a las modificaciones estructurales producidas por los cambios en el pH durante la digestión (Velderrain-Rodríguez y col., 2014). Cabe señalar que la mayor pérdida y transformación de compuestos fenólicos se produce en el intestino y el colon, no durante la digestión gástrica (Podsedek y col., 2014). Por tanto, realizar un proceso digestivo *in vitro* que simule de manera global las condiciones fisiológicas gastrointestinales puede proporcionar información valiosa sobre la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos y actividad biológica que ejercen frente a los factores de riesgo asociados al SMet.

# **Objetivos**





### 3. OBJETIVOS

En los últimos años se está produciendo una revalorización de las legumbres en la industria alimentaria por su alto contenido de compuestos bioactivos con efectos beneficiosos para la salud, como los péptidos bioactivos y los compuestos fenólicos. Sin embargo, existe un conocimiento muy limitado sobre su revalorización como ingredientes multifuncionales y, prácticamente, no se han identificado estrategias tecnológicas que permitan maximizar la bioaccesibilidad y actividad biológica de los compuestos bioactivos de legumbres. En este sentido, el desarrollo de procesos de fermentación en combinación con hidrólisis enzimática se plantea como una estrategia novedosa para la producción de ingredientes multifuncionales que contribuyan a frenar el inicio y desarrollo de enfermedades tan prevalentes como el SMet en los países occidentales.

La realización de la presente Tesis Doctoral tiene como **objetivo general** el desarrollo de un ingrediente multifuncional enriquecido en compuestos bioactivos bioaccesibles a partir de lenteja utilizando un proceso de fermentación combinado con hidrólisis enzimática a pH controlado dirigido a prevenir o revertir las distintas condiciones patológicas que caracterizan al SMet.

Para ello se han establecido los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudiar el efecto individual y combinado de los procesos de fermentación con *L. plantarum* e hidrólisis enzimática con Savinasa 16 L a pH controlado en el contenido de péptidos y compuestos fenólicos, así como en la actividad multifuncional frente al SMet en lenteja castellana.
2. Identificación de los compuestos bioactivos determinantes de la multifuncionalidad del ingrediente desarrollado.
3. Estudiar el efecto de la digestión gastrointestinal en el contenido de péptidos y compuestos fenólicos, así como en la actividad multifuncional frente al SMet del ingrediente desarrollado.
4. Maximizar el potencial bioactivo del ingrediente desarrollado mediante la optimización del tiempo y el pH del proceso combinado de fermentación e hidrólisis enzimática.
5. Estudiar el efecto del escalado a nivel de planta piloto del proceso combinado sobre el contenido de compuestos bioactivos y la actividad biológica del ingrediente desarrollado.
6. Identificar los mecanismos de acción antioxidante del ingrediente multifuncional obtenido a escala de planta piloto en un modelo celular de estrés oxidativo.



# **Resultados**





## 4. RESULTADOS

### 4.1. CAPÍTULO 1. Estudio del efecto individual y combinado de los procesos de fermentación e hidrólisis enzimática a pH controlado en el perfil de compuestos bioactivos y potencial multifuncional de la fracción soluble de lenteja (publicaciones 1 y 2).

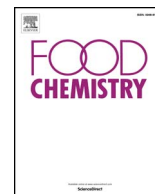
**Publicación 1.** Contribuciones individuales de Savinasa y *Lactobacillus plantarum* a la funcionalización de la lenteja durante la fermentación alcalina a pH controlado.

Sara Bautista-Expósito, Elena Peñas, Montserrat Dueñas, José Manuel Silván, Juana Frias, Cristina Martínez-Villaluenga. Individual contributions of Savinase and *Lactobacillus plantarum* to lentil functionalization during alkaline pH-controlled fermentation. *Food Chemistry*, 2018, 257: 341-349.

#### RESUMEN

Las legumbres ofrecen la posibilidad de desarrollar alimentos multifuncionales dirigidos al control de los componentes del SMet. El objetivo de esta publicación fue estudiar el efecto de la fermentación alcalina con *Lactobacillus plantarum* en combinación con la enzima Savinasa 16 L (FLPS) y los efectos individuales de ambos procesos sobre el contenido de péptidos, compuestos fenólicos y bioactividad de la lenteja. La combinación de ambos tratamientos dio lugar a un mayor aumento en el contenido de péptidos y de ciertos flavonoides, así como en la actividad antioxidante, inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) y la actividad sacarasa intestinal de la fracción soluble de lenteja en comparación con cada uno de los tratamientos por separado. La Savinasa contribuyó a la liberación de péptidos y al aumento de la actividad inhibidora de la ECA y antioxidante de la fracción soluble de lenteja. *L. plantarum* contribuyó principalmente a la modificación de la composición fenólica y a la actividad inhibidora de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales y la lipasa pancreática. Con el fin de identificar los compuestos bioactivos presentes en la fracción soluble de lenteja obtenida mediante el proceso combinado FLPS, se realizó un fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular y posterior cribado de actividades biológicas para seleccionar la fracción más activa. En dicha fracción se identificaron un total de 30 péptidos derivados de las proteínas convicilina, vicilina y lectina con características estructurales relacionadas con actividades inhibidora de la ECA, antioxidante e inhibidora de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales. Por otro lado, en la subfracción más activa, se identificaron principalmente glucósidos de kenferol y dímeros de prodelfinidina e isoramnetina glucurónido como compuestos minoritarios. Finalmente, se demostró que la DGI de lenteja fermentada (LF) obtenida por FLPS aumentó la bioaccesibilidad de péptidos y compuestos fenólicos, así como la actividad

antioxidante, aunque se observaron pérdidas en las actividades inhibidora de la ECA,  $\alpha$ -glucosidasas intestinales y lipasa pancreática. En conclusión, los resultados de este estudio demostraron que el proceso FLPS mejora el potencial multifuncional de la fracción soluble de la lenteja, constituyendo una estrategia efectiva para la funcionalización de esta legumbre.



## Individual contributions of Savinase and *Lactobacillus plantarum* to lentil functionalization during alkaline pH-controlled fermentation

Sara Bautista-Expósito<sup>a</sup>, Elena Peñas<sup>a</sup>, Montserrat Dueñas<sup>b</sup>, José Manuel Silván<sup>a</sup>, Juana Frias<sup>a</sup>, Cristina Martínez-Villaluenga<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Research Group on Polyphenols, Nutrition and Bromatology Unit, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Campus Miguel Unamuno, 37007 Salamanca, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Lentil  
pH-controlled fermentation  
Peptides  
Phenolic compounds  
Bioactivity  
Metabolic syndrome  
Savinase  
*L. plantarum*

### ABSTRACT

Legumes offer the possibility to develop multifunctional foods with benefits for metabolic syndrome. Our objective was to study the effect of alkaline fermentation by *Lactobacillus plantarum* and Savinase (FLPS) as well the individual effects of both processes on peptides, phenolics and bioactivity of lentil. FLPS increased peptides and some flavonoids and enhanced antioxidant activity, inhibition of angiotensin I-converting enzyme (ACE) and intestinal maltase activities of lentil soluble fraction. Savinase contributed to peptide release, ACE inhibitory and antioxidant activities of lentil soluble fraction. *L. plantarum* affected to phenolic composition,  $\alpha$ -glucosidase and lipase inhibitory activities. Mass spectrometry analysis of the most active fermented lentil subfraction allowed the identification of the main bioactive compounds. Gastrointestinal digestion of fermented lentil increased bioaccessibility of peptides and phenolics as well as antioxidant activity. FLPS enhanced the overall healthy potential of lentil offering the possibility of its use as strategy for lentil functionalization.

### 1. Introduction

Unhealthy life style has raised the risk of population for non-communicable diseases which are the leading cause of death and disability globally (World Health Organization, 2014). In this context, regular physical activity and healthy diets combined with the intake of functional foods may help minimizing or even preventing certain chronic diseases (Jew, AbuMweis, & Jones, 2009). Functional foods are commonly designed to reach one physiological target. Nowadays, the knowledge on the multifactorial origin of many chronic diseases provides a new framework for the development of multifunctional foods.

As a legume, lentil (*Lens culinaris* Medik.) provides excellent nutritional quality and an array of functional compounds, including phenolics (Zhang et al., 2015) and bioactive peptides (Garcia-Mora et al., 2017). Lentil bioactive compounds are known to bind physiological targets to affect various signaling processes or regulatory functions that can lead to health benefits. For instance, lentil phenolic compounds have demonstrated a potential health benefit for lipid and glucose homeostasis as these compounds are able to inhibit gastrointestinal enzymes involved in carbohydrate ( $\alpha$ -glucosidase) and lipid digestion (pancreatic lipase) (Zhang et al., 2015). Otherwise, lentil peptides derived from 11S and 7S globulins are able to bind angiotensin I-converting enzyme (ACE) and scavenge reactive oxygen species (ROS) *in*

*vitro* (Garcia-Mora et al., 2017). All these studies position lentil on the market as a promising and reliable raw material in multifunctional food development.

Bioprocessing is a research area with potential application to exploit the functional properties of legumes. In particular, enzymatic hydrolysis with food-grade alkaline serine proteases from *Bacillus spp.* has been used to produce lentil and pinto bean functional hydrolysates rich in antioxidant and ACE-inhibitory peptides and phenolic compounds (Garcia-Mora, Peñas, Frias, & Martínez-Villaluenga, 2014; 2015). Fermentation is also a well-designed biotechnology for manufacturing functional foods (Filannino, Di Cagno, & Gobetti, 2018). Metabolic features of lactic acid bacteria may improve the bioavailability and bioactivity of phytochemicals and peptides with beneficial consequences for human health. For instance, fermentation with *Lactobacillus plantarum* (FLP) has shown to increase free phenolic compounds and the antioxidant and antihypertensive potential of lentil flour (Torino et al., 2013). More recently, it has been observed that common bean fermentation by *L. plantarum* 299v enhances the release of peptides able to bind gut enzymes including intestinal  $\alpha$ -glucosidase, pancreatic lipase and  $\alpha$ -amylase (Jakubczyk, Karas, Zlotek, Szymanowska, 2017). Combination of proteolytic microbial strains and commercial enzymes is an alternative strategy used to functionalize milk fermented products as reviewed by Hafeez et al. (2014); however,

\* Corresponding author at: C/ Juan de la Cierva, 3, 28006, Madrid, Spain.

E-mail address: [c.m.villaluenga@csic.es](mailto:c.m.villaluenga@csic.es) (C. Martínez-Villaluenga).

it has not been explored in legumes. Microbial and commercial enzymes may act synergistically increasing peptide content and diversifying the bioactivity of fermented products.

In this research, we aimed to further investigate the impact of fermentation with *L. plantarum* CECT 748 and enzymatic hydrolysis by Savinase 16 L (FLPS) on bioaccessibility of peptides and phenolics as well as multifunctional properties of lentil. The individual effects of FLP and hydrolysis with Savinase (HS) were also examined to evaluate their contribution when they are used in combination. As far as we know, a similar quantitative approach has not been published yet and is, therefore, one of the merits of this study. Our second objective was to identify bioactive compounds through fractionation and bioassay-guided selection of the most multiactive fraction. Gastrointestinal digestion (GD) has been shown to modify peptide and phenolic composition of foods and as consequence their health benefits (Luzardo-Ocampo et al., 2017). As such, it is important that any bioactive peptide or phenolic compound released by fermentation should be resistant to GD so as to reach the physiological targets in an active form. Thus, in this study, the impact of simulated GD on peptide and phenolic content as well as the bioactivity of lentil soluble fraction was studied.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Lentil seeds (*Lens culinaris* Medik. var. Castellana) were purchased from Semillas Iglesias S.A. (Salamanca, Spain), milled (Moulinex, Allencón, France), passed through a 60-mesh sieve with 0.5 mm pore size and stored at 4 °C until use. A commercial food grade protease Savinase® 16 L (16 KNPU/g) was provided by Novozyme (Bagsvaerd, Denmark). *L. plantarum* CECT 748 was purchased from the Spanish Type Culture Collection (CECT, Valencia, Spain). MidiTrap™ G10 gel filtration columns were from GE Healthcare (Barcelona, Spain). Enzymes used including ACE (EC 3.4.15.1), rat intestine  $\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.20), porcine pancreatic lipase type II (EC 3.1.1.3), pepsin from porcine gastric mucosa (EC 3.4.23.1), pancreatin from porcine pancreas (EC 232-468-9) as well as other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) unless otherwise stated.

### 2.2. Techniques used for lentil processing

The following three processing techniques were implemented on lentil flour:

HS. Lentil flour was suspended in 1.5 L of sterile tap water (143 g/L final concentration), equilibrated at 37 °C and the pH adjusted to 8.5 with 1 M NaOH. Enzymatic hydrolysis was performed in a 3 L Bioflo/Celligen 115 bioreactor (Eppendorf Iberica, Madrid, Spain) with continuous stirring (300 rpm) and the addition of Savinase (365 mg/L final concentration) at 37 °C and pH 8.5 for 15 h.

FLP. One cryovial of *L. plantarum* CECT 748 was propagated using Man Rogosa Sharpe (MRS) broth (Pronadisa, Madrid, Spain) as described previously (Limon et al., 2015). After propagation, cells were harvested by centrifugation at 8000  $\times$  g for 10 min, washed twice, and suspended in sterile water at the minimum cell density of 8 log CFU/mL. Fermentation was carried out in a 3 L Bioflo/Celligen 115 bioreactor (Eppendorf Iberica, Madrid, Spain) mixing 1.5 L of sterile tap water with lentil flour (143 g/L final concentration) and *L. plantarum* ( $2 \times 10^8$  CFU/L final cell density) under stirring conditions (300 rpm) at 37 °C, pH 8.5 for 15 h.

FLPS. Starter culture was prepared as described above. *L. plantarum* ( $2 \times 10^8$  CFU/L final cell density), Savinase (365 mg/L final concentration) and lentil flour (143 g/L final concentration) were used to prepare a 1.5 L fermented flour suspension in a 3 L Bioflo/Celligen 115 bioreactor (Eppendorf Iberica, Madrid, Spain) with a continuous speed mixer (300 rpm) at 37 °C, pH 8.5 for 15 h.

Three independent replicates were conducted for each treatment.

Soluble fractions from all samples were obtained by centrifugation at 7500  $\times$  g at 5 °C for 15 min. Supernatants were stabilized by heating at 70 °C during 10 min for enzymatic and microbial inactivation. Soluble fraction from unfermented lentil flour was used as control. Finally, all samples were freeze-dried and stored under vacuum at –20 °C until use.

### 2.3. Fractionation of lentil soluble fraction by size exclusion chromatography

FLPS soluble fraction was subjected to size exclusion chromatography using MidiTrap™ G10 columns containing Sephadex G-10 in which molecules are separated on the basis of differences in size. Freeze-dried sample was dissolved in distilled water (20 mg/mL) and filtered through 0.45  $\mu$ m syringe filters. Column was equilibrated with 8 mL of deionized water. A sample volume of 0.3 mL followed by 0.3 mL of deionized water were added to the column allowing entering the packed bed completely and discarding the flow-through. Elution was carried out adding 2.5 mL of deionized water to the column and collecting five fractions (F1 to F5) containing 0.5 mL of eluate. Finally, collected fractions were lyophilized and stored at –20 °C until analysis.

### 2.4. In vitro GD of lentil samples simulating physiological conditions

FLPS soluble fraction was subjected to a sequential gastric and duodenal digestion according to the method described by Garcia-Mora et al. (2014). Briefly, FLPS was dissolved in simulated gastric fluid (SGF, 0.15 M NaCl; pH 2.5). Samples were pre-heated for 15 min at 37 °C. Then 400  $\mu$ L of a solution containing 0.59% (w/v) pepsin (3640 U/mg protein) in SGF were added and the pH was adjusted to 2.5 with 0.01 M HCl. Digestion was performed at 37 °C for 2 h and subsequently stopped by increasing the pH to 7.5 with 0.1 M NaOH. Gastric digest were adjusted to pH. 6.5 with 0.01 M HCl. In order to simulate a duodenal environment the following solutions were added: 150  $\mu$ L of a bile salt mixture containing equimolar quantities (0.125 M) of sodium taurocholate and glycodeoxycholic acid, 46  $\mu$ L of 1 M CaCl<sub>2</sub>, 500  $\mu$ L of 0.25 M Bis-Tris (pH 6.5), and 100  $\mu$ L of pancreatin in SGF at pH 7.0. Digestion was carried out at 37 °C for 2 h. Finally, pancreatin was inactivated by heating at 80 °C for 15 min.

### 2.5. Determination of peptide and total phenolic compounds contents

Peptide concentration was measured by Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay kit (Fisher Scientific, Madrid, Spain) in permeates obtained by ultrafiltration through cellulose membranes of 10 kDa pore size (Millipore, Billerica, MA, USA). Results were expressed as mg of peptides/g of soluble fraction. Total phenolic compounds were determined using the Folin-Ciocalteu method as previously described (Garcia-Mora et al., 2015). The absorbance was read at 690 nm using a Synergy HT multi-well plate reader (BioTek, Winooski, VT, USA) and the results were expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/g of soluble fraction.

### 2.6. Determination of individual phenolic compounds

Phenolics extraction from lentil samples was performed according to a previously described method (Dueñas, Martínez-Villaluenga, Limón, Peñas, & Frias, 2015). Briefly, lentil soluble fractions (2 g) were macerated in methanol:water:trifluoroacetic acid (80:19.9:0.1, v/v/v) at 4 °C for 16 h. Subsequently, they were centrifuged at 4000  $\times$  g and 5 °C for 20 min in a Sorval RC 5B super-speed centrifuge (GMI, San Diego, CA, USA). The extracts were concentrated at 30 °C under vacuum for methanol evaporation. For phenolic analysis, the dry extracts were dissolved in 10 mL of water. For purification, an aliquot (4 mL) was passed through a C18 Sep-Pak cartridge (Waters, Milford, MA, USA), previously activated with 2 mL of methanol followed by 3 mL of

distilled water.

Samples were analyzed using Hewlett–Packard 1100MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) chromatograph coupled to an HP Chem Station (rev.A.0504) data-processing software. Double online detection was carried out in the DAD using 280 nm and 370 nm as preferred wavelengths. Mass spectrometer connected to the high-performance liquid chromatography system via the diode array detector cell outlet was used and detection was performed in an API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) equipped with an electrospray ionization source, triple quadrupole-ion trap mass analyzer and controlled by the Analyst 5.1 software, following the method described by Dueñas et al. (2015).

Phenolic compounds were characterized according to their UV and mass spectra, retention time, and comparison with authentic standards when available. For quantitative analysis, calibration curves were prepared by injection of known concentrations of different standard compounds. The standards, vanillic, *trans-p*-coumaric acids, (+)-catechin, isorhamnetin 3-*O*-glucoside and kaempferol 3-*O*-rutinoside were obtained from Extrasynthese (Genay Cedex, France). Concentration of hexosides and quinic derivatives of vanillic, hydroxybenzoic and *p*-coumaric acids were calculated by external calibration curves of their corresponding free acids while concentration of derivatives of isorhamnetin, kaempferol and (+)-catechin were calculated by external calibration of isorhamnetin 3-*O*-glucoside, kaempferol 3-*O*-glucoside and (+)-catechin and prodelphinidin dimer. All samples were analyzed in duplicate. Data were expressed as µg/g of soluble fraction.

## 2.7. Identification of peptides and prediction of their biological activity potential

The proteomic analysis was performed by ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry analysis as previously described (García-Mora et al., 2017). Briefly, the most active fraction collected by size exclusion chromatography was purified using a C18 ZipTip reverse phase column (Millipore, Darmstadt, Germany) and injected in the linear trap quadrupole Orbitrap Velos (Fisher Scientific, Madrid, Spain). Peptides separated in a AcclaimPepMap C18 column (inner diameter 75 µm, 15 cm long, 3 µm particle size) (Fisher Scientific, Madrid, Spain) and eluted using a solvent gradient at a flow rate of 250 nL/min on a nanoEasy ultra-performance liquid chromatography coupled to a nanoelectrospray ion source (Fisher Scientific, Madrid, Spain). The mobile phases used consisted of 0.1% formic acid/2% acetonitrile in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B).

Proteome Discoverer 1.4.1.14 (Fisher Scientific, Madrid, Spain) with MASCOT 2.3 was used to search the *Lens culinaris* database (NCBI 427 sequences). Database search parameters used were the following: the cysteine carbamidomethylation and methionine oxidation were established as fixed modifications; precursor ion tolerance, 10 ppm; fragment ion tolerance, 0.5 Da. Peptides identification was validated through Percolator's algorithm using *q*-value ≤ 0.01.

## 2.8. ACE inhibitory activity

Lentil samples (0.3 mg/mL final concentration) were tested for ACE inhibitory activity following a previously described method (García-Mora et al., 2014). Fluorescence was read every minute for 30 min at emission and excitation wavelengths of 335 and 405 nm, respectively, in a microplate reader Synergy HT (BioTek, Winooski, VT, USA). The results were expressed as percent inhibition relative to the negative control having 100% enzymatic activity. All samples were analyzed in duplicate. IC<sub>50</sub> values (concentration of sample in mg/mL that inhibits 50% of the ACE activity) were calculated plotting the non-linear regression sigmoidal dose-response curves in GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 2.9. α-Glucosidase inhibitory activity

Lentil samples (1.7 mg/mL final concentration) were tested for α-glucosidase inhibitory activity following a previously described method (Vilcacundo, Martínez-Villaluenga, & Hernández-Ledesma, 2017). Glucose concentration in the reaction mixtures was determined using the Amplex® Red glucose/glucose oxidase assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Absorbance was measured using a Synergy HT plate reader (BioTek, Winooski, VT, USA) at 560 nm. Glucose concentration was calculated using a linear standard curve (0–200 µM) from a freshly prepared 400 mM stock solution. All samples were analyzed in duplicate. Percent inhibition of sucrase and maltase activity of intestinal α-glucosidase in the presence of lentil samples was calculated relative to the negative control having 100% enzyme activity.

## 2.10. Lipase inhibitory activity

The ability of the fractions to inhibit porcine pancreatic lipase was evaluated using a previously reported method (Kim et al., 2010). Lipase activity was determined by measuring the hydrolysis of *p*-nitrophenyl butyrate to *p*-nitrophenol at 405 nm using a microplate reader Synergy HT (BioTek, Winooski, VT, USA). All samples were analyzed in duplicate. Percent inhibition of lipase activity in the presence of lentil samples was calculated relative to the negative control having 100% enzyme activity.

## 2.11. Oxygen radical absorbance capacity

Radical scavenging activity of lentil samples was evaluated by fluorescence following the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay described previously (García-Mora et al., 2017). Briefly, fresh soluble fractions from all lentil samples were obtained after treatment by centrifugation at 7500 × *g* at 5 °C for 15 min. Supernatants were stabilized by heating at 70 °C during 10 min for enzymatic inactivation. Samples were tested using different dilution factors (50, 100 and 200). Fluorescence was measured in a Synergy HT microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA) at emission and excitation wavelengths of 520 nm and 485 nm, respectively. A Trolox standard curve with a linear concentration range (0–160 µM) was prepared from a freshly made 1 mM stock solution. All samples were analyzed in duplicate. Results were expressed as mM of Trolox equivalents (TE)/g of soluble fraction.

## 2.12. Protective effect on intracellular ROS generation

Murine macrophage cell line RAW 264.7 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) were maintained in Dulbecco's modified Eagles's medium (Lonza, Madrid, Spain) supplemented with 10% fetal bovine serum (Lonza, Madrid, Spain) and 1% penicillin/streptomycin (5000 U/mL) (Lonza, Madrid, Spain) at 37 °C in a humidified incubator containing 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. Cell viability was determined using Cell titer 96 Aqueous One Solution assay kit (Promega, Madison, WI, USA). A non-toxic and realistic physiological dose of 100 µg/mL (Supplemental Fig. S1) was used to examine the potential protective effect of lentil samples. Intracellular ROS were quantified by the dichlorofluorescein assay as previously described (Martin, Cordero-Herrera, Bravo, Ramos & Goya, 2014). Macrophages (2 × 10<sup>5</sup> cells/well) were pre-treated with lentil samples (0.1 mg/mL final concentration) dissolved in serum-free medium for 20 h. Cells were washed with phosphate buffer saline (PBS) and incubated with 20 µM 2,7-dichlorofluorescein diacetate (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) for 30 min. After that, cells were washed with PBS and treated with serum-free medium containing 2.5 mM *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). ROS production was monitored for 3 h by fluorescence at an excitation and emission wavelengths of 485 nm and 530 nm, respectively using a Synergy HT plate reader (BioTek, Winooski, VT, USA). Control cells with and without *t*-BOOH treatment were used as

**Table 1**  
Peptides, individual and total phenolic compounds of bioaccessible (soluble) fraction from control and bioprocessed lentil flour (HS, FLP, FLPS).

Compounds	Control	HS	FLP	FLPS
Peptides (mg/g)	63.06 ± 2.81 <sup>a</sup>	230.60 ± 8.02 <sup>c</sup>	99.62 ± 4.10 <sup>b</sup>	229.99 ± 8.06 <sup>c</sup>
<i>Individual phenolic compounds</i>				
Dimer prodelphinidin (GC-C) (µg/g)	111.70 ± 10.53 <sup>b</sup>	14.13 ± 0.59 <sup>a</sup>	16.23 ± 0.17 <sup>a</sup>	10.85 ± 2.70 <sup>a</sup>
(+)-catechin-3-O-glucoside (µg/g)	267.33 ± 3.98 <sup>c</sup>	62.71 ± 5.13 <sup>b</sup>	12.55 ± 1.93 <sup>a</sup>	16.11 ± 0.80 <sup>a</sup>
<i>trans-p</i> -coumaric acid derivative (µg/g)	24.23 ± 0.27 <sup>c</sup>	nd <sup>a</sup>	2.23 ± 0.16 <sup>b</sup>	3.35 ± 1.23 <sup>b</sup>
(+)-catechin (µg/g)	41.10 ± 3.25 <sup>c</sup>	8.79 ± 0.22 <sup>a</sup>	12.61 ± 1.37 <sup>b</sup>	17.96 ± 1.85 <sup>b</sup>
<i>trans-p</i> -coumaroyl malic acid (µg/g)	14.18 ± 0.56 <sup>c</sup>	nd <sup>a</sup>	14.37 ± 0.99 <sup>c</sup>	11.93 ± 1.32 <sup>b</sup>
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid (µg/g)	7.71 ± 0.86 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	22.29 ± 0.43 <sup>c</sup>	48.40 ± 1.01 <sup>d</sup>
<i>trans-p</i> -coumaroyl glycolic acid (µg/g)	25.71 ± 2.88 <sup>d</sup>	nd <sup>a</sup>	8.27 ± 1.09 <sup>b</sup>	14.82 ± 1.15 <sup>c</sup>
Vanillic acid (µg/g)	2.66 ± 0.73 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	14.91 ± 0.63 <sup>c</sup>	16.17 ± 1.52 <sup>d</sup>
Kaempferol dirutinoid (µg/g)	631.29 ± 38.14 <sup>b</sup>	328.99 ± 8.42 <sup>a</sup>	677.91 ± 21.62 <sup>c</sup>	609.39 ± 52.85 <sup>b</sup>
Kaempferol rutinoside-hexoside (µg/g)	62.04 ± 1.24 <sup>c</sup>	19.33 ± 0.84 <sup>a</sup>	45.81 ± 1.81 <sup>b</sup>	45.04 ± 1.45 <sup>b</sup>
Isorhamnetin glucuronide (µg/g)	30.90 ± 4.14 <sup>a</sup>	27.13 ± 0.96 <sup>a</sup>	43.78 ± 0.40 <sup>b</sup>	30.90 ± 4.29 <sup>a</sup>
<i>trans-p</i> -coumaric acid (µg/g)	41.61 ± 1.43 <sup>c</sup>	nd <sup>a</sup>	2.99 ± 0.31 <sup>b</sup>	4.17 ± 1.15 <sup>b</sup>
Kaempferol rutinoside-rhamnoside (I) (µg/g)	42.11 ± 0.29 <sup>d</sup>	1.55 ± 0.35 <sup>a</sup>	23.78 ± 1.21 <sup>b</sup>	26.39 ± 0.69 <sup>c</sup>
Kaempferol rutinoside-rhamnoside (II) (µg/g)	8.65 ± 1.19 <sup>b</sup>	3.52 ± 0.58 <sup>a</sup>	14.44 ± 0.77 <sup>c</sup>	13.93 ± 2.61 <sup>c</sup>
Kaempferol (µg/g)	8.90 ± 1.49 <sup>c</sup>	nd <sup>a</sup>	2.81 ± 0.10 <sup>b</sup>	10.54 ± 2.18 <sup>c</sup>
Total identified phenolics (µg/g)	1320.12 ± 170.35 <sup>c</sup>	466.15 ± 21.20 <sup>a</sup>	914.96 ± 24.21 <sup>b</sup>	879.93 ± 60.49 <sup>b</sup>

Data are the mean ± standard deviation of three replicates analyzed in duplicate. Different lowercase letters indicate statistical differences among treatments ( $p < 0.05$ , Duncan's test). HS = alkaline enzymatic hydrolysis with Savinase 16 L; FLP = alkaline fermentation with *L. plantarum* CECT 748; FLPS = alkaline fermentation with *L. plantarum* CECT 748 and enzymatic hydrolysis with Savinase 16 L; GC-C: gallo catechin-catechin; nd: not detected.

positive and negative controls, respectively. All samples were analyzed in duplicate. The results were expressed as percentage inhibition of ROS generation relative to *t*-BOOH-stressed cells.

### 2.13. Statistical analysis

Experimental data represent the mean and standard deviation of three replicates analyzed in duplicate. Statistical significance of the data was tested by one-way analysis of variance, followed by the Duncan test to compare the means that showed significant variation ( $p < 0.05$ ); all of the statistical analyses were performed using Statgraphics Plus software, version 5.1 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Effect of processing on peptide, total and individual phenolic concentration of lentil bioaccessible (soluble) fraction

As compared among treatments, HS and FLPS soluble fractions showed significantly higher peptide concentrations than FLP (Table 1), which indicates that generation of peptides in FLPS is mainly attributed to Savinase protease activity. Our results are consistent with previous studies showing Savinase as one of the most efficient commercial enzymes to hydrolyze lentil proteins (García-Mora et al., 2014). *L. plantarum* CECT 748 was also able to release peptides from lentil proteins at alkaline pH although in a lesser extent than Savinase. In consistency with our results, recent studies have demonstrated that *L. plantarum* strains are able to release peptides from different legume protein sources (Singh & Vij, 2017; Jakubczyk, Karas, Zlotek, & Szymanowska, 2017). *L. plantarum* genome does not encode the extracellular protease Prt that is involved in primary breakdown of proteins (Kleerebezem et al., 2003). However, it has uptake systems for peptides (Opp and Dtp) and produces intracellular peptidases of different specificity. Therefore, generation of peptides in FLP could have been caused by the action of *L. plantarum* CECT 748 peptidases.

Prior to lentil treatment, Hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids were found as minor soluble phenolic compounds in lentil (8% and 1% of total soluble phenolics, respectively) while flavonoids were the most prominent phenolic group (Table 1). Flavonols (kaempferol aglycone and glucosides as well as isorhamnetin glucuronide) accounted for 76% of the total soluble phenolics, being kaempferol

dirutinoid the most abundant compound. (+)-Catechin-3-O-glucoside was the main flavan-3-ol found in the soluble fraction followed by prodelphinidin dimer and (+)-catechin. Phenolic composition of non-processed lentil was consistent with the phenolic profiles of the lentil flour (Supplemental Table S1) and previous reported results for 20 Canadian lentil cultivars in which flavonoid glycosides, mainly kaempferol glycosides, are the major extractable phenolics of lentils and in much lower amounts *p*-coumaric and *p*-hydroxybenzoic acids (Zhang et al., 2015). Sum of concentrations of all phenolic compounds detected in control lentil was 1320.12 µg/g of soluble fraction.

After lentil processing, significant qualitative and quantitative differences were observed in the total and individual phenolic content of lentil soluble fraction (Table 1). It was observed that the sum of all identified phenolic compounds was significantly lower in HS and FLP compared to control ( $p < 0.05$ ). Hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids became undetectable in HS that was composed mainly by flavonols and flavan-3-ols. This finding does not agree with our recent study where we have shown that the combined action of protease and esterase activities of Savinase increased the bioaccessibility of phenolic compounds that were bound to polysaccharides and proteins in pinto bean (García-Mora et al., 2015). This could be explained by lower time of hydrolysis (5h vs 15h used in the present work), and hence, lower phenolic compounds degradation in alkaline conditions. For instance, the stability of catechins is pH-dependent; they are very unstable in alkaline solutions diminishing their content by 70–80% at pH 7.4 within 60 min (Hur, Lee, Kim, Choi, & Kim, 2014). Similarly, lentil fermentation in alkaline conditions generally decreased individual phenolic concentrations, although for certain compounds similar or increased concentrations were observed. In particular, fermentation did not affect *p*-coumaroyl malic acid concentration; however, significantly higher concentrations of *p*-hydroxybenzoic and vanillic acids, isorhamnetin glucuronide and kaempferol dirutinoid were found in FLP ( $p < 0.05$ ). Microbial metabolism of *L. plantarum* CECT 748 was responsible for the changes observed in the phenolic profiles of lentil soluble fraction. *L. plantarum* produces carbohydrases, β-glucosidases and a wide range of esterases which are highly specific and effective in releasing bound phenolic compounds that are cross-linked to plant cell wall matrix (Esteban-Torres, Reverón, Santamaría, de las Rivas, & Muñoz, 2015). Therefore, the increased bioaccessibility of *p*-hydroxybenzoic and vanillic acids, isorhamnetin glucuronide and kaempferol dirutinoid in FLP could be due to microbial enzymatic activities. Free *p*-coumaric acids may be

decarboxylated or reduced by *L. plantarum* phenolic acid decarboxylases or reductases to the corresponding phenol or vinyl derivatives (Filannino, Di Cagno, & Gobetti, 2018). Therefore, these microbial metabolic pathways could explain the reduction of soluble *p*-hydroxycinnamic compounds in FLP. On the other hand, microbial metabolism along with alkaline-induced degradation could explain the lower content of some flavonoid compounds such as (+)-catechin and (+)-catechin-3-*O*-glucoside (Hur et al., 2014).

Sum of concentrations of all phenolic compounds identified in FLPS (879.93 µg/g) was lower than in control. Combined enzymatic hydrolysis and fermentation reduced individual concentration of some phenolic compounds ( $p < 0.05$ ). Conversely, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid and kaempferol rutoside-rhamnoside II concentrations significantly increased ( $p < 0.05$ ). On the other hand, there were no significant differences in kaempferol dirutinoside, isorhamnetine glucuronide and kaempferol concentrations in the soluble fraction of FLPS compared to control ( $p > 0.05$ ). As explained above, phenolic composition of FLPS may be attributed to *L. plantarum* CECT 784 metabolism, protease and esterase activities of Savinase as well as alkaline-induced degradation (Hur et al., 2014; Garcia-Mora et al., 2015; Filannino et al., 2018). As compared among treatments, individual phenolics concentrations of FLPS were closer to FLP and sums of concentrations of all identified compounds were not significantly different ( $p > 0.05$ ). Therefore, we may assume that *L. plantarum* metabolism was the main contributor to the phenolic profiles of FLPS.

### 3.2. Effect of processing on biological activity of lentil bioaccessible (soluble) fraction

This research objectively evaluated whether combined fermentation and enzymatic hydrolysis enhance the potential health benefits of lentil bioaccessible fraction. Moreover, results in Table 2 facilitate examination of the individual effects of HS and FLP on enzyme inhibition abilities (ACE,  $\alpha$ -glucosidase and lipase inhibitory) and antioxidant activity of lentil soluble fraction. In order to elucidate the mechanisms by which changes in the biological activities of lentil soluble fraction have occurred, comparisons of FLPS to HS and FLP were performed and attributed to peptide content and phenolic profiles.

ACE inhibition through dietary compounds has been proven as an efficient strategy to reduce blood pressure *in vivo*, which constitutes a key point to prevent or delay the cardiovascular disease risk of hypertension (Lee & Hur, 2017). ACE inhibitory activity of bioaccessible fraction at 0.5 mg/mL was improved in HS, FLP and FLPS from undetectable (in control sample) to 61.5–85.3% inhibition ( $p < 0.05$ ). FLPS showed the lowest IC<sub>50</sub> value (IC<sub>50</sub> = 0.14 mg/mL), followed by

HS (IC<sub>50</sub> = 0.18 mg/mL) and FLP (IC<sub>50</sub> = 0.29 mg/mL), suggesting that combination of fermentation and enzymatic hydrolysis enhanced inhibition of ACE. Moreover, ACE inhibitory activity of FLPS was found higher than reported values for legumes fermented with *L. plantarum* strains (IC<sub>50</sub> = 0.19–0.53 mg/mL) (Singh & Vij, 2017; Jakubczyk et al., 2017; Torino et al., 2013) and within the range (IC<sub>50</sub> = 0.08–0.3 mg/mL) of reported values for lentil hydrolysates produced by commercial proteases (Garcia-Mora et al., 2014). As compared by the IC<sub>50</sub> values of the different lentil treatments, it may be indicated that Savinase was the main contributor to the ACE inhibitory activity of FLPS. Our earlier studies have demonstrated the suitability of Savinase compared to other commercial enzymes to produce lentil hydrolysates with a high yield of ACE inhibitory peptides (Garcia-Mora et al., 2014). This higher efficiency of Savinase to generate ACE inhibitory peptides has been attributed to its specificity for aromatic and hydrophobic residues at position P1 (Garcia-Mora et al., 2017). As determined by the IC<sub>50</sub> value of FLP, *L. plantarum* could also be contributing to the ACE inhibitory activity of FLPS through generation of ACE inhibitory peptides as reported previously in fermented legumes (Torino et al., 2013; Singh & Vij, 2017; Jakubczyk et al., 2017). Phenolic acids and flavonoids have proven to inhibit ACE activity *in vitro*, although this biological effect has been shown at supra-physiological concentrations (IC<sub>50</sub> ranging from 0.23 to 9.30 mM) (Al Shukor et al., 2013). These results along with the absence of evidence in the literature of associations between ACE inhibitory activity of fermented foods and changes in the phenolic profiles, suggest that generation of peptides by *L. plantarum* and Savinase is the only mechanism for the improvement of ACE inhibitory activity observed in FLPS.

Small intestinal  $\alpha$ -glucosidases, maltase-glucoamylase (MGAM) and sucrase-isomaltase (SI), break down disaccharides and glucose oligomers, releasing glucose for the enterocyte uptake. These enzymes have two homologous functional units on the respective C- and N-terminal (Ct and Nt, respectively) of their original protein that differ in substrate specificity (Gericke, Schecker, Amiri, & Naim, 2017). In MGAM, Ct has a higher specificity for glucose oligomers while Nt has been ascribed as the maltase subunit. Ct-SI and Nt-SI subunits display distinctive sucrase and isomaltase activities, respectively. It is a fact that the inhibition of the intestinal  $\alpha$ -glucosidases may have multiple positive health implications related to control of the glycemic response profile of starchy foods and perhaps eliciting the ileal break and gut-brain axis response to reduce appetite and food intake (Simsek et al., 2015). One achievement of our study is that inhibitory effect of lentil soluble fraction was investigated for both sucrase and maltase activities of intestinal rat  $\alpha$ -glucosidases unlike most previous works. This methodological approach was adequate to allow measurement of selective

**Table 2**

Biological activity of bioaccessible (soluble) fraction from control and processed lentil (HS, FLP and FLPS) including i) lung ACE-inhibitory activity expressed as percentage of inhibition relative to the assay control and IC<sub>50</sub> in mg/mL; ii) intestinal  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity expressed as percentage inhibition of sucrase and maltase activities relative to the assay control; iii) pancreatic lipase inhibition expressed as percentage inhibition relative to the assay control; iv) ORAC expressed in mM TE/g; and v) chemoprotective activity against oxidative stress expressed as percentage reduction of ROS generation relative to *t*-BOOH-stressed RAW 264.7 macrophages.

Biological activity	Lentil treatment			
	Control	HS	FLP	FLPS
ACE inhibition (%)	nd	76.54 ± 0.94 <sup>b</sup>	61.48 ± 5.89 <sup>a</sup>	85.35 ± 2.36 <sup>c</sup>
ACE inhibition (IC <sub>50</sub> , mg/mL)	1.10 ± 0.26 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>a,§</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>a,*</sup>
$\alpha$ -glucosidase inhibition (%)				
Sucrase activity	81.11 ± 5.02 <sup>d</sup>	19.83 ± 0.15 <sup>a</sup>	31.73 ± 1.33 <sup>b</sup>	53.24 ± 8.72 <sup>c</sup>
Maltase activity	29.99 ± 1.40 <sup>b</sup>	37.82 ± 2.10 <sup>c</sup>	22.09 ± 2.86 <sup>a</sup>	38.06 ± 0.17 <sup>c</sup>
Lipase inhibition (%)	90.46 ± 6.50 <sup>d</sup>	9.96 ± 4.98 <sup>a</sup>	44.46 ± 0.64 <sup>c</sup>	39.67 ± 3.64 <sup>b</sup>
ORAC (mM TE/g)	302.69 ± 25.58 <sup>b</sup>	384.46 ± 22.70 <sup>c</sup>	260.11 ± 23.60 <sup>a</sup>	508.78 ± 48.14 <sup>d</sup>
Inhibition of ROS generation (%)	17.60 ± 1.13 <sup>a</sup>	42.32 ± 2.42 <sup>bc</sup>	49.53 ± 4.56 <sup>c</sup>	40.13 ± 2.48 <sup>b</sup>

Data are the mean ± standard deviation of three replicates analyzed in duplicate. Different lowercase letters indicate statistical differences among experimental groups ( $p < 0.05$ , Duncan's test). <sup>§</sup>Significantly lower than FLP and HS ( $p < 0.05$ ). <sup>\*</sup>Significantly lower than FLP ( $p < 0.05$ ). HS = alkaline enzymatic hydrolysis with Savinase 16 L; FLP = alkaline fermentation with *L. plantarum* CECT 748; FLPS = alkaline fermentation with *L. plantarum* CECT 748 and enzymatic hydrolysis with Savinase 16 L; ACE: Angiotensin I converting enzyme; ORAC: oxygen radical absorbance capacity; ROS: radical oxygen species. nd: not detected.

inhibition of individual  $\alpha$ -glucosidases. Lentil soluble fraction at 1 mg/mL strongly inhibited sucrase (81.11%) and maltase (29.99%) activities (Table 2). Lentil phenolic compounds, especially kaempferol and quercetin glycosides, were described as good inhibitors of intestinal  $\alpha$ -glucosidases (Zhang et al., 2015). Interestingly, lentil soluble fraction inhibited more potently sucrase than maltase activity, which suggests a selective inhibition mode of lentil soluble fraction. Consistently with our findings, Simsek, Quezada-Calvillo, Feruzzi, Nichols, and Hamaker (2015) demonstrated that individual phenolic compounds are selective inhibitors of individual mucosal  $\alpha$ -glucosidase subunits. For instance, (+)-catechin, a phenolic compound detected in lentil soluble extracts, inhibited more potently SI than MGAM subunits which is consistent with our results (Simsek et al., 2015). Lentil treatment reduced significantly the sucrase inhibitory activity of the soluble fraction (Table 2,  $p < 0.05$ ). Significant losses of some phenolic compounds during HS, FLP and FLPS may explain the decrease in sucrase inhibitory activity of lentil soluble fractions. Conversely, HS and FLPS showed a higher inhibition of maltose digestion than control; however, in FLP maltase inhibitory activity was significantly reduced ( $p < 0.05$ ). Among treatments, FLPS showed a better hypoglycemic potential through inhibition of digestion of both maltose and sucrose compared to HS and FLP. As compared by the percentages of inhibition, it seems that both Savinase and *L. plantarum* were contributors to the maltase inhibitory activity of FLPS while Savinase was mainly contributing to the sucrase inhibitory activity of FLPS. Taking into account that legume peptides have been described as inhibitors of  $\alpha$ -glucosidases (Mojica, Luna-Vital, & de Mejia, 2017; Jakubczyk et al., 2017), and that Savinase contributed to the release of peptides rather than phenolics in the present study, we may assume that besides phenolics, peptides could be also responsible for the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of FLPS. Although we have not studied further the FLPS process, these initial findings related to the selective inhibition of small intestine  $\alpha$ -glucosidases by lentil peptides and phenolics justify additional studies.

Inhibition of pancreatic lipase through dietary compounds has also been proposed to have a positive health impact to control hyperlipidaemia and weight gain through suppression and delay of triglyceride digestion and absorption (Finer, James, Kopelman, Lean, & Williams, 2000). Lentil soluble fraction showed a potent pancreatic lipase inhibitory activity at 2 mg/mL (90.46% inhibition,  $IC_{50} < 2$  mg/mL, Table 2). This effect was mainly attributed to phenolic compounds, being kaempferol glycosides and aglycones the most potent inhibitors followed by quercetin arabinoside and aglycone (Zhang et al., 2015). After lentil treatment, a significant loss of lipase inhibitory activity was observed in the soluble fraction ( $p < 0.05$ ). In the present study, a correlation analysis indicated a strong positive association ( $r = 0.998$ ,  $p < 0.05$ ) between total content of kaempferol glycosides and aglycones and lipase inhibitory activity of lentil soluble fractions. This finding indicated that decrease of lipase inhibitory activity of lentil soluble fractions was likely due to degradation of kaempferols during bioprocessing. Lipase inhibitory activity decreased with lentil treatment as follows: HS > FLPS > FLP, suggesting that FLP preserve in a greater extent than Savinase the lipase inhibitory activity of lentil. In contrast with the results obtained for other bioactive compounds, our findings indicate that FPLS did not enhance the potential of lentil to control hyperlipidemia and weight gain through pancreatic lipase inhibition.

Oxidative stress has been involved in different pathologies, including metabolic syndrome and numerous cardiovascular diseases. The antioxidant and chemopreventive effects of lentil after bioprocessing was investigated by chemical (ORAC method) and cellular assays using the RAW 264.7 macrophage cell line. The ORAC values of lentil soluble fraction were within the range of previously reported values for different legumes (Zhang et al., 2015, Singh & Vij, 2017). Phenolic compounds display antioxidant activity although low correlations previously found between ORAC values and total phenolic compounds and flavonoid content indicate that these compounds are not the only

antioxidants in lentil (Zhang et al., 2015). FLPS was shown to be approximately two times more effective for increasing the peroxy scavenging activity of lentil soluble fraction than HS and FLP ( $p < 0.05$ ), therefore, combination of both bioprocesses may synergically generate antioxidant compounds acting as radical scavengers through hydrogen donating mechanisms. We have observed that HS increased significantly ORAC values of lentil soluble fraction as opposed to FLP that showed a lower antioxidant activity compared to control ( $p < 0.05$ ). These results indicated that Savinase could be contributing in a greater extent to the antioxidant activity of FLPS. Savinase hydrolysis has previously shown to enhance ORAC values of lentil due to generation of small peptides able to donate hydrogen atoms (Garcia-Mora et al., 2014; 2015). Similarly, FLP has demonstrated to enhance ORAC in different legumes due to bioconversion of native phenolics (Torino et al., 2013; Limon et al., 2015).

To test the cytoprotective effect of lentil soluble fractions in stressful conditions, a model of oxidative stress induced by a potent pro-oxidant was established based on previous studies (Lv et al., 2017). *t*-BOOH can induce cell damage, mainly by overproduction of ROS, inhibiting cell viability and inducing cell apoptosis. Before starting the study, different *t*-BOOH concentrations were tested to assure that toxicity by oxidative stress on RAW 264.7 macrophages was produced. Results show that concentrations over 2.5 mM evoke significant cell damage and over 50% cell death (Supplemental Fig. S2). Interestingly, cell pretreatment with lentil soluble fraction significantly reduced ROS overproduction induced by *t*-BOOH ( $p < 0.05$ ). As with our results, Xuan et al. (2013) demonstrated that lentil extracts can attenuate Angiotensin II-induced cardiomyocytes hypertrophy via decreasing ROS levels. In this study, antioxidant effect of lentil extracts against angiotensin II-induced oxidative stress were attributed to phenolic compounds which provide parallel protection by ROS quenching and activation of cell antioxidant defense system. Our results indicated that all treatments were effective to enhance the protective effects of lentil against oxidative stress (Table 2). The highest chemopreventive potential was found in FLP nearly followed by HS and FLPS. Unlike ORAC data, it was not found a clear synergistic effect of Savinase and *L. plantarum* combination on inhibition of cellular oxidative stress. The effects of fermentation or enzymatic hydrolysis on the chemopreventive potential of lentil on a cellular model of oxidative stress has not been investigated so far. Although we observed significant losses in native phenolic compounds from hydrolysis and fermentation in alkaline conditions these compositional changes did not affect the chemopreventive potential of lentil against oxidative stress. These findings led us to believe that other as yet unidentified compounds contribute to the observed biological activity. Upon examining the literature it is possible that microbial metabolites, peptides, or new compounds formed by condensation and oxidation reactions occurring during enzymatic and/or fermentation could be responsible for the observed effects (Filannino et al., 2018; Hur et al., 2014).

### 3.3. Bioactivity-guided selection of most active subfractions from FLPS

To identify and characterize the bioactive compounds released during FLPS, fractionation of soluble fraction was performed to obtain five subfractions (F1-F5) that were screened for their total peptide and phenolic contents as well as their health-promoting potential (Table 3). Fractions showed different peptide and phenolic composition and bioactive profile. All the bioactivities tested were found in all fractions with the exception of F3, F4 and F5 in which lipase inhibitory activity was not detected. Comparing the bioactivity data, there were two main outstanding fractions: F1 and F5. Fraction F1, composed by 56% peptides and 5% phenolics, had the highest ACE and lipase inhibitory activities and antioxidant potential measured as inhibition of ROS generation in *t*-BOOH challenged RAW 264.7 macrophages. Moreover, F1 inhibited noticeably maltose digestion by intestinal  $\alpha$ -glucosidase and showed a high antioxidant value measured as ORAC. Fraction F5 made

**Table 3**

Peptides content, total phenolic content, ACE-inhibitory,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory, lipase-inhibitory and antioxidant activities of five FLPS subfractions collected by size exclusion chromatography (F1-F5).

	F1	F2	F3	F4	F5
Peptides (mg/g)	560.26 $\pm$ 27.20 <sup>c</sup>	274.67 $\pm$ 19.19 <sup>b</sup>	231.59 $\pm$ 13.18 <sup>a</sup>	534.67 $\pm$ 41.01 <sup>c</sup>	918.08 $\pm$ 35.90 <sup>d</sup>
Phenolics (mg GAE/g)	50.48 $\pm$ 1.71 <sup>b</sup>	36.77 $\pm$ 2.47 <sup>a</sup>	61.15 $\pm$ 2.00 <sup>c</sup>	84.58 $\pm$ 7.12 <sup>d</sup>	106.03 $\pm$ 10.47 <sup>c</sup>
ACE inhibition (%)	88.21 $\pm$ 6.78 <sup>c</sup>	30.81 $\pm$ 2.27 <sup>b</sup>	23.34 $\pm$ 2.41 <sup>a</sup>	44.88 $\pm$ 2.87 <sup>c</sup>	51.38 $\pm$ 3.79 <sup>d</sup>
$\alpha$ -glucosidase inhibition (%)					
Sucrase activity	nd	nd	14.95 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	18.61 $\pm$ 1.76 <sup>a</sup>	23.81 $\pm$ 1.46 <sup>b</sup>
Maltase activity	39.56 $\pm$ 5.37 <sup>a</sup>	50.68 $\pm$ 0.72 <sup>b</sup>	52.30 $\pm$ 0.72 <sup>b</sup>	52.50 $\pm$ 3.55 <sup>b</sup>	59.43 $\pm$ 1.07 <sup>c</sup>
Lipase inhibition (%)	40.27 $\pm$ 4.49 <sup>a</sup>	34.06 $\pm$ 4.50 <sup>a</sup>	nd	nd	nd
ORAC (mM TE/g)	497.77 $\pm$ 24.97 <sup>b</sup>	305.70 $\pm$ 6.99 <sup>a</sup>	338.19 $\pm$ 13.69 <sup>a</sup>	528.45 $\pm$ 43.07 <sup>b</sup>	592.67 $\pm$ 46.06 <sup>c</sup>
Inhibition of ROS generation (%)	45.36 $\pm$ 1.74 <sup>b</sup>	46.69 $\pm$ 2.60 <sup>b</sup>	22.68 $\pm$ 4.98 <sup>a</sup>	39.43 $\pm$ 4.98 <sup>b</sup>	26.33 $\pm$ 1.95 <sup>a</sup>

Data are the mean  $\pm$  standard deviation of three replicates analyzed in duplicate. Different lowercase letters indicate statistical differences among fractions ( $p < 0.05$ , Duncan's test). FLPS = alkaline fermentation with *L. plantarum* CECT 748 and enzymatic hydrolysis with Savinase 16 L; GAE: gallic acid equivalents; ACE: Angiotensin I converting enzyme; ORAC: oxygen radical absorbance capacity; ROS: radical oxygen species; nd: not detected.

up of 91% peptides and 10% phenolics showed the highest  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity and ORAC. In contrast, F5 showed the weakest inhibition for ROS generation in *t*-BOOH-induced RAW 264.7 macrophages and inhibition of pancreatic lipase activity was not detected. Therefore, F1 was selected based on its multifunctional activity for characterization of bioactive peptides and phenolics.

### 3.4. Composition of FPLS active fraction

To gain insight into bioactive compounds contributing to multifunctional activity of FLPS, peptide and phenolic profiles of subfraction F1 were analyzed.

#### 3.4.1. Peptide profile

Most abundant peptides in subfraction F1 are presented in Table 4. A total of 30 fragments with molecular masses within the range of 1100 to 3200 Da were identified. These peptides derived from the major lentil proteins: convicilin, vicilin (allergen Len c 1.0101 and 1.0102)

and lectin. Some peptides showed a good potential as ACE-inhibitory and antioxidant peptides. We identified three previously reported peptides (DLAIPVNNPGQLESF, LVNEGKGNLELVGF and EITPEKPNQLQDLDF) with dual antioxidant and ACE-inhibitory activities (García-Mora et al., 2017). Upon examination of amino acid sequences, many of the lentil peptides in Table 4 contained aromatic (phenylalanine), hydrophobic (valine, leucine, glycine, proline, phenylalanine) and positively charged amino acids (arginine and histidine) in the C<sub>t</sub>-tripeptide which has been described as determinant residues for ACE inhibitory activity. Moreover, amino acid sequences containing proline, histidine or tyrosine within the sequence and N<sub>t</sub> and/or C<sub>t</sub> hydrophobic amino acids are determinant for antioxidant activity (Li & Li, 2013). These structural features were found in most of the peptides collected in Table 4. Antioxidant activity of histidine residues is due to hydrogen-donating and radical-trapping mechanisms, tyrosine residues can donate hydrogen to reduce free radicals and hydrophobic amino acids may increase interaction between peptides and fatty acids radicals (Li & Li, 2013). Legume derived peptides are emerging as promising  $\alpha$ -

**Table 4**

Most abundant peptides identified in subfraction F1 collected by size exclusion chromatography of lentil bioaccessible (soluble) fraction from FLPS.

Protein accessions	Sequence	Parent proteins	MH+ (Da)
7688242	SGREKWERKEDEEKVVEEEGEWRGS	Convicilin	3192.47
29539109	FNTEYEEIEKVLLEEQ	Allergen Len c 1.0101	2012.96
29539109	FNTEYEEIEKVLL	Allergen Len c 1.0101	1626.82
29539109	FNTEYEEIEKVLLEEQEQKSQ	Allergen Len c 1.0101	2613.25
29539111	FNTDYEEIEKVLL	Allergen Len c 1.0102	1612.80
29539109	FNTEYEEIEKVLE	Allergen Len c 1.0101	1755.86
29539109	NTEYEEIEKVLL	Allergen Len c 1.0101	1479.75
29539111	NTDYEEIEKVLL	Allergen Len c 1.0102	1465.74
26800840; 62910855; 7428789	KDVVPEWVRIGFS	Lectin, Lectin precursor	1531.82
29539109; 29539111	NLERGDTIKLPA	Allergen Len c 1.0101 and c 1.0102	1326.74
29539111	FNTDYEEIEKVLLEDQEQEPQHR	Allergen Len c 1.0102	2889.34
7688242	LNTRYDTIEKVLLEEQENEPH	Convicilin	2542.26
29539111	DLAIPVNNPGQLESF	Allergen Len c 1.0102	1613.81
7688242	LVNPDDEEDLRVVD	Convicilin	1774.84
7688242	SLNTRYDTIEKVLLEEQENEPH	Convicilin	2629.29
29539109; 29539111	YEEIEKVLL	Allergen Len c 1.0101 and c 1.0102	1135.62
29539111	FNTDYEEIEKVLLEDQEQEPQHRR	Allergen Len c 1.0102	3045.44
29539109	FNTEYEEIEKVL	Allergen Len c 1.0101	1513.74
7688242	TKYDTIEKVLLEEQENEPH	Convicilin	2315.13
29539111	FNTDYEEIEKVLLEDQEQEPQHRRS	Allergen Len c 1.0102	3132.47
29539109	FNTEYEEIEKVLLEEQEQKSQ	Allergen Len c 1.0101	2750.31
29539109; 29539111	EITPEKPNQLQDLDF	Allergen Len c 1.0101 and c 1.0102	1899.96
7688242	LVNEGKGNLELVGF	Convicilin	1488.80
26800840; 62910855; 7428789	KDVVPEWVRIGFS	Lectin, Lectin precursor	1602.86
164512514; 7688242	REQSPGQWRPSHGKEEDEEKEQKEAQ	Convicilin	3251.49
29539109	NTEYEEIEKVLLEEQEQKSQ	Allergen Len c 1.0101	2466.17
29539109	FNTEYEEIEKVLLEEQEQK	Allergen Len c 1.0101	2398.16
164512514; 7688242	EDEEKVVEEEGEWRGS	Convicilin	2035.87
29539109; 29539111	KFGKFFEITPEKPNQLQ	Allergen Len c 1.0101 and c 1.0102	2051.09
26800840; 62910855; 7428789	KDVVPEWVRIGF	Lectin, Lectin precursor	1444.79

**Table 5**  
Phenolic compounds identified in fraction F1 collected by size exclusion chromatography of lentil bioaccessible (soluble) fraction from FLPS.

Compounds	Concentration ( $\mu\text{g/g}$ )
Dimer prodelphinidin (GC-C)	$0.33 \pm 0.11$
(+)-catechin-3-O-hexoside	$0.25 \pm 0.10$
Kaempferol rutinoside-hexoside	$1.00 \pm 0.45$
Isorhamnetin glucuronide	$0.14 \pm 0.03$
Kaempferol rutinoside-rhamnoside (II)	t

Data are the mean  $\pm$  standard deviation analyzed in triplicate. t: traces.

FLPS = alkaline fermentation with *L. plantarum* CECT 748 and enzymatic hydrolysis with Savinase 16 L; GC-C: gallic catechin-catechin; t: traces.

glucosidase inhibitors for the treatment of type 2 diabetes (Mojica, Luna-Vital, & González de Mejía, 2017). Typical structural features of food-derived peptides for high  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity consist of the presence of amino acids containing a hydroxyl or basic side chain at the N-terminal (serine, threonine and tyrosine), proline within the chain and alanine or methionine at the C-terminal (Ibrahim, Bester, Neitz, & Gaspar, 2017). All these residues at positions relevant for high inhibitory activity were found in peptide REQSPGQWRPSHGKEEDEE-EKEQKEAQ derived from convicilin.

### 3.4.2. Phenolic compounds

Phenolic profiles and individual phenolic concentrations of subfraction F1 are shown in Supplemental Fig. S3 and Table 5, respectively. Five flavonoids were identified: prodelphinidin dimer, (+)-catechin-3-O-hexoside, kaempferol rutinoside-hexoside, isorhamnetin glucuronide and kaempferol rutinoside-rhamnoside (II). The kaempferol rutinoside-hexoside was the most abundant compound ( $1 \mu\text{g/g}$ ) accounting for 58% of the total phenolics of F1. Flavonoids are well known antioxidants that may exert their action through several mechanisms. Earlier studies have shown that lentil flavonoids are able to neutralize radicals and chelate metal ions through hydrogen, electron donating and mixed mechanisms (Zhang et al., 2015). Kaempferol has also shown protective effects against oxidative stress through activation of nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2)-mediated defensive response in lung tissues (Kumar, Kim, More, Kim & Choi, 2014). Kaempferol glucosides and aglycone have proven to be good inhibitors of intestinal  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase activities (Tan, Chang, & Zhang, 2017; Zhang et al., 2015). There is also evidence that prodelphinidin dimers are able to bind and inhibit pancreatic lipase activity (Buchholz & Melzig, 2015). All this information retrieved from the literature support the idea that phenolic compounds identified in F1 are likely contributing to the bioactivity of FLPS.

### 3.5. Effect of simulated GD on chemical composition and biological activity of FLPS

GD extends protein and phenolic chemical modifications and, as consequence, may promote the release of new bioactive compounds and/or degradation of existing ones. Therefore, we studied the modifications induced by simulated GD on chemical composition and biological activities of FLPS (Table 6). GD approximately increased 2-fold the peptide content ( $p < 0.05$ ). These results indicated that new peptides are released by gastrointestinal proteases and peptidases. Similarly, total phenolic content was found 5-fold greater in the FLPS lentil digest ( $p < 0.05$ ). A higher  $\text{IC}_{50}$  value was found for ACE-inhibitory activity of the digest suggesting that GD reduced the ACE inhibitory activity of FLPS ( $p < 0.05$ ). We previously observed this effect for lentil hydrolysates produced by Savinase in high-pressure conditions (García-Mora et al., 2015). This loss of activity could be explained by degradation of ACE inhibitory peptides in FLPS by gastrointestinal proteases. Similarly,  $\alpha$ -glucosidase and lipase inhibitory activities of FLPS were significantly reduced after simulated GD ( $p < 0.05$ ). Our

**Table 6**  
Peptides and total phenolic content and biological activities of bioaccessible (soluble) fraction from FLPS before and after gastrointestinal digestion.

	Control	Digest
Peptides (mg/g)	$229.99 \pm 8.06^a$	$442.55 \pm 39.39^b$
Phenolics (mg GAE/g)	$65.91 \pm 5.60^a$	$321.41 \pm 4.85^b$
ACE inhibition ( $\text{IC}_{50}$ , mg/mL)	$0.14 \pm 0.01^a$	$0.23 \pm 0.02^b$
$\alpha$ -glucosidase inhibition (%)		
Sucrase activity	$53.24 \pm 8.72^a$	$39.41 \pm 2.24^a$
Maltase activity	$38.06 \pm 0.17^b$	nd
Lipase inhibition (%)	$26.69 \pm 4.12^b$	nd
ORAC (mM TE/g)	$508.78 \pm 48.14^a$	$556.77 \pm 37.13^a$
Inhibition of ROS generation (%)	$40.13 \pm 2.48^a$	$66.58 \pm 1.81^b$

Data are the mean  $\pm$  standard deviation of three replicates analyzed in duplicate. Different lowercase letters indicate statistical differences among treatments ( $p < 0.05$ , Duncan's test). GAE: gallic acid equivalents; ACE: Angiotensin I converting enzyme; ORAC: oxygen radical absorbance capacity; ROS: radical oxygen species; nd: not detected.

data suggest that lentil phenolic compounds able to inhibit these enzymes were degraded during GD of FLPS. In this regard, recent studies have demonstrated that pH changes along GD of common bean chips cause modifications in chemical structure, molecular weight or chemical completion of phenolic compounds (Luzardo-Ocampo et al., 2017). Alternatively, ORAC of FLPS was not affected by GD while inhibition of ROS production was significantly greater after simulated GD ( $p < 0.05$ ). Consistently to results of the present study, we previously observed that GD of lentil antioxidant peptides produced by Savinase released shorter peptide sequences and free amino acids with higher antioxidant activity than the precursor peptides (García-Mora et al., 2017). Other possibility is that the increase in free phenolics observed after GD could also be responsible for the higher protective effect of FLPS to reduce ROS production in *t*-BOOH-stressed macrophages.

Recent studies have found that bioactivity of foods changes differently along the digestive tract. These changes in bioactivity have been attributed to chemical modifications of bioactive compounds mediated by digestive enzymes, physiological pH or microbial fermentation (Luzardo-Ocampo et al., 2017). Findings of our study have shown overall compositional and bioactivity changes occurred in FLPS at the end of gastroduodenal digestion although it could not be established whether health-promoting potential of FLPS increased or decreased in previous stages of digestion. Therefore, to overcome the limitations of the present study a quantitative follow-up of biological activity along the whole digestion process would represent a novel approach to understand and predict fermented lentil functionality *in vivo*.

## 4. Conclusions

In conclusion, the present study demonstrates that FLPS enhanced the overall health potential benefit of lentil in relation to blood pressure, blood glucose absorption, lipid accumulation and oxidative stress. These findings were associated to synergistic effect of Savinase mainly producing bioactive peptides and microbial metabolism mainly responsible for increased concentrations of *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid and kaempferol glucosides. Fractionation of FLPS and selection of the most multiactive lentil subfraction allowed identifying 30 fragments from convicilin, allergen Len c1 and lectin as well as the flavonoids prodelphinidin dimer, (+)-catechin-3-O-hexoside, kaempferol rutinoside-hexoside, isorhamnetin glucuronide and kaempferol rutinoside-rhamnoside (II) as the main bioactive compounds. We also determined that GD caused an increase in bioaccessible peptides and phenolics and antioxidant activity. However, losses on ACE-,  $\alpha$ -glucosidase and lipase inhibitory activities were detected. From these data it can be advised that from a nutraceutical perspective, FLPS would be the most beneficial treatment of commercial production of lentil functional products. This research is unique in the context of lentil functionalization by a pH-controlled fermentative-hydrolytic process and the

health benefits of FPLS were validated *in vivo* in a rat model of metabolic syndrome (Martínez et al., 2018).

## Acknowledgements

The research leading to these results received funding from Ministry of Economy and Competitiveness, Spain (MINECO, Spain) and FEDER, European Commission program [grant number AGL2013-43247-R] and Spanish National Research Council, Spain [grant number 2016701044]. E. P. acknowledges to MINECO and European Social Fund for her “Ramón y Cajal” contract.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.044>.

## References

- Al Shukor, N., Van Camp, J., Gonzales, G. B., Staljanssens, D., Struijs, K., Zotti, M. J., ... Smagghe, G. (2013). Angiotensin-converting enzyme inhibitory effects by plant phenolic compounds: A study of structure activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(48), 11832–11839.
- Buchholz, T., & Melzig, M. F. (2015). Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors. *Planta Medica*, *81*, 771–783.
- Dueñas, M., Martínez-Villaluenga, C., Limón, R. I., Peñas, E., & Frias, J. (2015). Effect of germination and elicitation on phenolic composition and bioactivity of kidney beans. *Food Research International*, *70*, 55–63.
- Esteban-Torres, M., Landete, J. M., Reverón, I., Santamaría, L., de las Rivas, B., & Muñoz, R. (2015). A *Lactobacillus plantarum* esterase active on a broad range of phenolic esters. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*, 3235–3242.
- Filannino, P., Di Cagno, R., & Gobetti, M. (2018). Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: Get out of the labyrinth. *Current Opinion in Biotechnology*, *49*, 64–72.
- Finer, N., James, W. P., Kopelman, P. G., Lean, M. E., & Williams, G. (2000). One-year treatment of obesity: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre study of orlistat, a gastrointestinal lipase inhibitor. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, *24*, 306–313.
- García-Mora, P., Frias, J., Peñas, E., Zielinski, H., Gimenez-Bastida, J. A., Wiczkowski, W., & Martínez-Villaluenga, C. (2015). Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) proteins by subtilisins. *Journal of Functional Foods*, *18*, 319–332.
- García-Mora, P., Martín-Martínez, M., Angeles Bonache, M., González-Múniz, R., Peñas, E., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2017). Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. *Food Chemistry*, *221*, 464–472.
- García-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2014). Savinase, the most suitable enzyme for releasing peptides from lentil (*Lens culinaris* var. Castellana) protein concentrates with multifunctional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*, 4166–4174.
- Gericke, B., Schecker, N., Amiri, M., & Naim, H. Y. (2017). Structure-function analysis of human sucrase-isomaltase identifies key residues required for catalytic activity. *Journal of Biological Chemistry*, *292*, 11070–11078.
- Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L., & Dary-Mourat, A. (2014). Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Research International*, *63*, 71–80.
- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y.-C., Choi, I., & Kim, G.-B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, *160*, 346–356.
- Ibrahim, M. A., Bester, M. J., Neitz, A. W. H., & Gaspar, A. R. M. (2017). Structural properties of bioactive peptides with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. *Chemical Biology and Drug Design* Article in Press.
- Jakubczyk, A., Karas, M., Zlotek, U., & Szymanowska, U. (2017). Identification of potential inhibitory peptides of enzymes involved in the metabolic syndrome obtained by simulated gastrointestinal digestion of fermented bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Food Research International*, *100*, 486–496.
- Jew, S., Abuweis, S. S., & Jones, P. J. H. (2009). Evolution of the human diet: Linking our ancestral diet to modern functional foods as a means of chronic disease prevention. *Journal of Medicinal Food*, *12*, 925–934.
- Kim, Y. S., Lee, Y. M., Kim, H., Kim, J., Jang, D. S., Kim, J. H., & Kim, J. S. (2010). Anti-obesity effect of *Morus bombycis* root extract: Anti-lipase activity and lipolytic effect. *Journal of Ethnopharmacology*, *130*, 621–624.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., Van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., ... Siezen, R. J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*, 1990–1995.
- Kumar, H., Kim, I.-S., More, S. V., Kim, B.-W., & Choi, D.-K. (2014). Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Natural Products Report*, *31*, 109–139.
- Lee, S. Y., & Hur, S. J. (2017). Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. *Food Chemistry*, *228*, 506–517.
- Li, Y. W., & Li, B. (2013). Characterization of structure-antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: Key sequence positions and their amino acid properties. *Journal of Theoretical Biology*, *318*, 29–43.
- Limon, R. I., Peñas, E., Torino, M. I., Martínez-Villaluenga, C., Dueñas, M., & Frias, J. (2015). Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extracts. *Food Chemistry*, *172*, 343–352.
- Lv, H., Liu, Q., Zhou, J., Tan, G., Deng, X., & Ci, X. (2017). Daphnetin-mediated Nrf2 antioxidant signaling pathways ameliorate tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)-induced mitochondrial dysfunction and cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, *106*, 38–52.
- Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Gaytán-Martínez, M., Preciado-Ortiz, R., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2017). Bioaccessibility and antioxidant activity of free phenolic compounds and oligosaccharides from corn (*Zea mays* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) chips during *in vitro* gastrointestinal digestion and simulated colonic fermentation. *Food Research International*, *100*, 304–311.
- Martín, M. A., Cordero-Herrera, I., Bravo, L., Ramos, S., & Goya, L. (2014). Cocoa flavanols show beneficial effects in cultured pancreatic beta cells and liver cells to prevent the onset of type 2 diabetes. *Food Research International*, *63*, 400–408.
- Martínez, R., Kapravelou, G., Donaire, A., Lopez-Chaves, C., Arrebola, F., Galisteo, M., ... López-Jurado, M. (2018). Effects of a combined intervention with a lentil protein hydrolysate and a mixed training protocol on the lipid metabolism and hepatic markers of NAFLD in Zucker rats. *Food and Function*, *9*, 830–850.
- Mojica, L., Luna-Vital, D. A., & González de Mejía, E. (2017). Characterization of peptides from common bean protein isolates and their potential to inhibit markers of type-2 diabetes, hypertension and oxidative stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*, 2401–2410.
- Simsek, M., Quezada-Calvillo, R., Feruzzi, M. G., Nichols, B. L., & Hamaker, B. R. (2015). Dietary phenolic compounds selectively inhibit the individual subunits of maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase with the potential of modulating glucose release. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 3873–3879.
- Singh, B. P., & Vij, S. (2017). Growth and bioactive peptides production potential of *Lactobacillus plantarum* strain C2 in soymilk: A LC-MS/MS based revelation for peptides biofunctionality. *LWT – Food Science and Technology*, *86*, 293–301.
- Tan, Y., Chang, S. K. C., & Zhang, Y. (2017). Comparison of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera. *Food Chemistry*, *214*, 259–268.
- Torino, M. I., Limón, R. I., Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C., & Frias, J. (2013). Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry*, *136*, 1030–1037.
- Xuan, C. L., Yao, F. R., Guo, L. R., Liu, Q., Chang, S. K., Liu, K. X., & Sun, C. W. (2013). Comparison of extracts from cooked and raw lentil in antagonizing angiotensin II-induced hypertension and cardiac hypertrophy. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *17*, 2644–2653.
- Vilcacundo, R., Martínez-Villaluenga, C., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Release of dipeptidyl peptidase IV,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, *35*, 531–539.
- World Health Organization (2014). *Global status report on non-communicable diseases*. Genève, Switzerland: World Health Organization 280.
- Zhang, B., Deng, Z., Ramdath, D. D., Tang, Y., Chen, P. X., Liu, R., ... Tsao, R. (2015). Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chemistry*, *172*, 862–872.



---

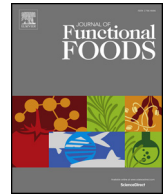
**Publicación 2.** Combinación de la fermentación a pH controlado en condiciones ligeramente ácidas e hidrólisis enzimática con Savinasa para mejorar las propiedades promotoras de la salud de la lenteja.

Sara Bautista-Expósito, Cristina Martínez-Villaluenga, Montserrat Dueñas, José Manuel Silván, Juana Frias, Elena Peñas. Combination of pH-controlled fermentation in mild acidic conditions and enzymatic hydrolysis by Savinase to improve metabolic health-promoting properties of lentil. *Journal of Functional Foods*, 2018, 48:9-18.

#### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad de la fermentación con *Lactobacillus plantarum* CECT 748 en combinación con la hidrólisis enzimática empleando Savinasa (FLPS) a pH ligeramente ácido (pH 6,8) para producir un ingrediente multifuncional de lenteja dirigido a controlar los componentes del SMet. El impacto de FLPS se comparó con los efectos individuales de la fermentación con *L. plantarum* (FLP) e hidrólisis con Savinasa (HS), aplicados por separado. La fracción soluble de lenteja obtenida por FLPS exhibió un contenido más elevado en péptidos, ácido *p*-hidroxibenzoico y flavonoles y mayor actividad antioxidante e inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) y  $\alpha$ -glucosidasas intestinales que aquella procesada mediante FLP y HS. *L. plantarum* fue responsable de los cambios en el perfil fenólico y la actividad inhibidora de la actividad maltasa de la lenteja sometida a FLPS, mientras que la Savinasa contribuyó a la liberación de péptidos y a las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA y de la actividad sacarasa. La fracción soluble de lenteja más activa obtenida mediante FLPS contenía 3 péptidos con actividad biológica potencial y flavonoides y ácidos fenólicos como los principales compuestos fenólicos. La DGI simulada del ingrediente FLPS aumentó el contenido de péptidos y compuestos fenólicos, así como las actividades inhibidora de la ECA y antioxidante. Este estudio abre nuevas oportunidades con respecto a la producción de ingredientes multifuncionales a partir de lenteja para el control del SMet.





# Combination of pH-controlled fermentation in mild acidic conditions and enzymatic hydrolysis by Savinase to improve metabolic health-promoting properties of lentil

Sara Bautista-Expósito<sup>a</sup>, Cristina Martínez-Villaluenga<sup>a</sup>, Montserrat Dueñas<sup>b</sup>,  
Jose Manuel Silván<sup>a</sup>, Juana Frias<sup>a</sup>, Elena Peñas<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Research Group on Polyphenols, Nutrition and Bromatology Unit, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Campus Miguel Unamuno, 37007 Salamanca, Spain

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Lentil  
pH-controlled fermentation  
*Lactobacillus plantarum*  
Savinase  
Bioactivity  
Metabolic syndrome

## ABSTRACT

This work evaluated the feasibility of pH-controlled fermentation by *Lactobacillus plantarum* CECT 748 combined with Savinase-hydrolysis (LPHS) for producing multifunctional lentil ingredients targeted for metabolic syndrome (MetS) relieving. LPHS process was compared with *L. plantarum*-fermentation (LP) and Savinase-hydrolysis (HS), applied separately. LPHS soluble fraction exhibited higher peptides, *p*-hydroxybenzoic acid, flavonols, antioxidant (400.74 mM TE/g), angiotensin I-converting enzyme (ACE) (95.43%) and  $\alpha$ -glucosidase-inhibitory activities (40.55 and 25.03% for maltase and saccharase activities, respectively) than LP and HS. *L. plantarum* was responsible for the phenolic profile changes and sucrose inhibitory activity of LPHS while Savinase contributed to peptides release and ACE and maltase inhibitory and antioxidant activities. The most active LPHS fraction contained 3 peptides with potential biological activity and flavonoids and phenolic acids. LPHS simulated gastrointestinal digestion enhanced its peptides, phenolics, ACE-inhibitory and antioxidant activities. This study opens new opportunities regarding the production of lentil-multifunctional ingredients for MetS management.

## 1. Introduction

Chronic diseases are increasingly viewed as a global health concern due to their escalating incidence and because they are responsible for 70% of deaths worldwide. Metabolic risk factors as raised blood pressure, overweight/obesity, hyperglycemia and hyperlipidemia strongly contribute to increase the risk of these diseases (World Health Organization, 2013). In this sense, metabolic syndrome (MetS), a cluster of metabolic factors that include insulin resistance, impaired glucose tolerance, hypertension, dyslipidemia and central obesity, has emerged in the last decade as a serious public health challenge (Santhekadur, Kumar, Seneshaw, Mirshahi, & Sanyal, 2017), since it enhances the risk of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular diseases in a greater extent than its individual components (Rodríguez-Monforte, Sánchez, Barrio, Costa, & Flores-Mateo, 2017).

The modification of diet is a keystone for preventing MetS development (Grosso et al., 2017). Providing consumers with a wider spectrum of healthy food options can offer new opportunities to modify the natural course of MetS. Agri-food sector is progressively addressing toward the development of plant-based products that contains, besides

essential nutrients, bioactive ingredients endowed with disease-preventing effects. It has been well established that hypertension, abdominal obesity, inflammation and excessive activity of enzymes involved in glucose metabolism are associated to the development of MetS. Therefore, the production of multifunctional foods targeting these metabolic dysfunctions associated to MetS may represent an interesting approach in the primary and secondary prevention of this pathology.

Regular consumption of lentils (*Lens culinaris* L.), a key food of the Mediterranean diet, has been demonstrated to offer protection against metabolic alterations associated to MetS due to the presence of a wide range of bioactive compounds (Bautista-Expósito, Peñas, Dueñas, et al., 2018; Bautista-Expósito, Peñas, Silván, Frias, Martínez-Villaluenga, 2018; Martínez et al., 2016). Lentil is a rich source of phenolic compounds, mainly phenolic acids, catechin, procyanidins and flavonols that are able to scavenge free radicals or to activate pathways related to oxidative stress defense (Alshikh, de Camargo, & Shahidi, 2015), to inhibit the expression of pro-inflammatory molecules (Zhang et al., 2017), and to modulate the activity of enzymes involved in lipid and glucose metabolism (Zhang et al., 2015). Moreover, our group has

\* Corresponding author.

E-mail address: [elenape@ictan.csic.es](mailto:elenape@ictan.csic.es) (E. Peñas).

recently identified biologically active peptides derived from legumin, vicilin and convicilin lentil proteins with antioxidant and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity (García-Mora, Frias, et al., 2015; García-Mora, Peñas, Frias, Gomez, & Martínez-Villaluenga, 2015; García-Mora et al., 2017). Due to the presence of these compounds, together with its high content of resistant starch and dietary fiber, lentil represents a valuable ingredient for the elaboration of functional foods focused in amelioration of MetS disturbances.

Fermentation and enzymatic hydrolysis constitute promising processing technologies for development of lentil novel foods due to its ability to enhance their nutraceutical properties through increasing the content and bioaccessibility of bioactive compounds. Within this context, recent studies have shown that lentil and bean proteolysis by Savinase, a commercial food grade alkaline protease derived from *Bacillus spp.*, released bioactive peptides and bound-phenolics with *in vitro* antioxidant and antihypertensive effects (García-Mora, Peñas, Frias, & Martínez-Villaluenga, 2014; García-Mora, Frias, et al., 2015; García-Mora, Peñas, et al., 2015; García-Mora et al., 2017). This enzyme was most effective than other food-grade enzymes in releasing these bioactive compounds from legumes (García-Mora et al., 2014). Additionally, there is evidence that lactic-acid fermentation with selected starter cultures enhanced the content of certain compounds with antioxidant, hypolipidaemic and ACE-inhibitory activities in lentil and other legumes (Jakubczyk, Karaś, Złotek, & Szymanowska, 2017; Kapravelou et al., 2015; Limón et al., 2015; Torino et al., 2013). However, the application of lactic acid fermentation for improving bioactive properties of legumes exhibits some limitations. Firstly, most lactic acid bacteria have low proteolytic activity that can difficult the release of bioactive peptides from legume proteins. Secondly, the reduction of pH during the course of lactic acid fermentation may decrease the solubility of legume proteins and phenolics, thus reducing their health-promoting properties. Combination of lactic-acid fermentation at selected pH with enzymatic hydrolysis by food-grade enzymes may overcome the limitations of fermentation technology increasing, at the same time, the health beneficial effects of legumes compared with the application of both technologies separately. A study recently performed by our group (Bautista-Expósito, Peñas, Dueñas, et al., 2018) has found the combination of both technologies at alkaline pH improved the health-promoting properties of lentil. However, studies at neutral or acid pHs that are more suitable for lactic-acid bacteria growth have not been performed so far. Lentil processed by combined fermentation and hydrolysis treatments could constitute valuable ingredients for designing novel functional foods such as dairy products, fruit juices or snacks.

Most of the studies focused on the evaluation of the impact of technological processes on biological effects of plant processed foods offer valuable information on the chemical identification of bioactive compounds responsible for their bioactivity. However, little is known on the stability and biological activity of constituents in vegetable processed foods subjected to gastrointestinal digestion. The use of *in vitro* gastrointestinal models are powerful alternatives to *in vivo* studies to evaluate the gastrointestinal stability of bioactive food compounds, since they have not ethical restrictions and are less expensive (Minekus et al., 2014).

The current study was, therefore, conducted to explore the feasibility of fermentation by *L. plantarum* CECT 748 in combination with enzymatic hydrolysis by an alkaline-serine protease (Savinase® 16 L) for producing a multifunctional ingredient aimed at relieving the metabolic disturbances associated to MetS. Fermentation and hydrolysis processes applied separately were also evaluated in order to elucidate their individual contribution when used in combination. The identification of peptides and phenolic compounds in the most bioactive fraction obtained after fractionation of lentil flour soluble fraction subjected to combined treatments and the influence of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioactive compounds and biological activity of processed lentil flour was also evaluated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant materials

Lentil seeds (*Lens culinaris* L. var. Castellana) were provided by Semillas Iglesias S.A. (Salamanca, Spain), ground in a coffee-mill (Moulinex, Allencçon, France), passed through a 60-mesh sieve (0.5 mm pore size) and stored in a vacuum-sealed plastic bag at 4 °C until use.

### 2.2. Chemicals and reagents

Savinase® 16 L (16 KNPU/g) enzyme was purchase from Novozymes (Bagsvaerd, Denmark) and *L. plantarum* CECT 748 from the Spanish Type Culture Collection (CECT, Valencia, Spain). MidiTrap™ G10 gel filtration columns were from GE Healthcare (Barcelona, Spain). Angiotensin-I converting enzyme (ACE, EC 3.4.15.1), rat intestine  $\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.20), pepsin from porcine gastric mucosa (EC 3.4.23.1), pancreatin from porcine pancreas (EC 232-468-9) as well as other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) unless otherwise specified.

### 2.3. Lentil flour technological treatments.

Lentil flour was subjected to three different processing treatments:

- (A) *Hydrolysis by Savinase (HS)*. Lentil flour was suspended in 1.5 L of sterile tap water (143 g/L final concentration), placed in 3 L Bioflo/Celligen 115 bioreactor (Eppendorf Iberica, Madrid, Spain) equilibrated at 37 °C and the pH was adjusted to 6.8 with 1 M NaOH. Then, Savinase was added (365 mg/L final concentration) and enzymatic hydrolysis was conducted under continuous stirring (300 rpm) at 37 °C, pH 6.8 for 25.5 h.
- (B) *Fermentation using L. plantarum CECT 748 as starter culture (LP)*. Lentil flour fermentation was conducted in a 3 L Bioflo/Celligen 115 bioreactor (Eppendorf Iberica, Madrid, Spain) by mixing lentil flour suspended in tap water (143 g/L final concentration) with *L. plantarum* 748 from the Spanish Type Culture Collection (CECT) ( $2 \times 10^8$  CFU/L final cell density), previously grown in Man Rogosa Sharpe (MRS) broth (Pronadisa, Madrid, Spain) as recently described (Bautista-Expósito, Peñas, Dueñas, et al., 2018; Bautista-Expósito, Peñas, Silván, et al., 2018). Fermentation was performed under stirring (300 rpm) at 37 °C, pH 6.8 for 25.5 h.
- (C) *Fermentation with L. plantarum CECT 748 combined with hydrolysis by Savinase (LPHS)*. Lentil flour suspension prepared in 1.5 L of tap water (143 g/L final concentration) was mixed with *L. plantarum* starter culture ( $2 \times 10^8$  CFU/L final cell density), previously propagated as described above, and with Savinase (365 mg/L final concentration). Combined treatments was performed in a 3 L Bioflo/Celligen 115 bioreactor (Eppendorf Iberica) under stirring (300 rpm) at 37 °C, pH 6.8 for 25.5 h.

Three independent experiments were carried out for each treatment. Lentil flour suspension without Savinase and *L. plantarum* addition was used as control. Soluble fractions from all samples were obtained by centrifugation (7500g, 5 °C, 15 min). Supernatants were heated at 70 °C during 10 min for enzymatic and bacterial inactivation. Finally, all samples were freeze-dried and stored under vacuum at -20 °C until further analysis.

### 2.4. Fractionation of LPHS by size exclusion chromatography

Soluble fraction obtained from LPHS sample was subjected to size exclusion chromatography using MidiTrap™ G10 columns containing Sephadex G-10. Briefly, freeze-dried sample was dissolved in distilled water (20 mg/mL) and filtered through 0.45  $\mu$ m syringe filters. Column was equilibrated with 8 mL of deionized water. A sample volume of

0.3 mL followed by 0.3 mL of deionized water were added to the column allowing entering the packed bed completely and discarding the flow-through. Elution was carried out adding 2.5 mL of deionized water to the column. Five fractions (F1-F5) of 0.5 mL of eluate were collected, freeze-dried and stored at -20 °C until further analysis.

### 2.5. *In vitro* gastrointestinal digestion of LPHS

LPHS soluble fraction was subsequently subjected to a sequential *in vitro* digestion with porcine pepsin and pancreatin as previously described (García-Mora et al., 2014). Briefly, LPHS was dissolved in simulated gastric fluid (SGF, 0.15 M NaCl, pH 2.5) and incubated at 37 °C for 15 min. Then 400 µL of a solution containing 0.59% (w/v) pepsin (3640 U/mg protein) in SGF was added and the pH was adjusted to 2.5 with 0.01 M HCl. Digestion was performed at 37 °C for 2 h in a Thermomixer™ orbital shaker (Eppendorf Iberica) with moderate agitation and subsequently stopped by raising the pH to 7.5 with 0.1 M NaOH. The pH of the digest obtained by gastric digestion was adjusted to 6.5 with 0.01 M HCl. Further, to simulate the duodenal digestion phase the following solutions were added: 150.8 µL of a bile salt mixture containing equimolar quantities (0.125 M) of sodium taurocholate and glycodeoxycholic acid, 46.08 µL of 1 M CaCl<sub>2</sub>, 500 µL of 0.25 M Bis-Tris (pH 6.5), and 100 µL of pancreatin in SGF at pH 7.0. Digestion was conducted at 37 °C for 2 h and subsequently stopped by heating at 80 °C for 15 min.

### 2.6. Determination of peptide content

Peptide concentration was measured by Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay kit (Fisher Scientific, Madrid, Spain) in permeates obtained by ultrafiltration through cellulose membranes of 10 kDa pore size (Millipore, Billerica, MA, USA). Results were expressed as mg of peptides/g of soluble fraction.

### 2.7. Determination of individual phenolic compounds

For the quantification of individual phenolic compounds, 2 g of lentil soluble fractions obtained from all samples were macerated in methanol:TFA:water 80:19.9:0.1 (v/v/v) at 4 °C for 16 h. Subsequently, they were centrifuged at 4000g and 5 °C for 20 min in a super-speed centrifuge (Sorval RC 5B). The extracts were concentrated at 30 °C under vacuum for methanol evaporation. For phenolic analysis, the dry extracts were dissolved in 10 mL of water. For purification, an aliquot (4 mL) was passed through a C18 Sep-Pak cartridge (Waters, Milford, MA, USA), previously activated with methanol followed by water.

Samples were analyzed using Hewlett–Packard 1100MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) chromatograph coupled to an HP Chem Station (rev.A.0504) data-processing software. Double online detection was carried out in the DAD using 280 nm and 370 nm as preferred wavelengths. Mass spectrometer (MS) connected to the HPLC system via the DAD cell outlet was used and detection was performed in an API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) equipped with an ESI source, triple quadrupole-ion trap mass analyser and controlled by the Analyst 5.1 software, following the method previously described by Barros et al. (2013).

Phenolic compounds were characterized according to their UV, mass spectra, retention times, and comparison with authentic standards when available. For quantitative analysis, calibration curves were prepared by injection of known concentrations of different standard compounds. The standards, vanillic, *trans-p*-coumaric acids, quercetin 3-*O*-rutinoside, quercetin 3-*O*-glucoside and kaempferol 3-*O*-rutinoside were obtained from Extrasynthese (Genay, France). Concentration of hexosides and quinic derivatives of protocatechuic, vanillic, caffeic, ferulic and *p*-coumaric acids were calculated by external calibration curves of their corresponding free acids while concentration of derivatives of quercetin and kaempferol were calculated by external

calibration of kaempferol 3-*O*-glucoside and quercetin 3-*O*-glucoside. All samples were analyzed in duplicate. The content of total phenolic compounds was determined as the sum of the contents of individual phenolic compounds. Data were expressed as µg/g of soluble fraction.

### 2.8. Determination of total phenolic compounds in LPHS fractions

Total phenolic compounds of F1-F5 fractions obtained from LPHS sample by size exclusion chromatography were quantified by a colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent, as previously described (Bautista-Expósito, Peñas, Dueñas, et al., 2018; Bautista-Expósito, Peñas, Silván, et al., 2018). The absorbance was measured at 690 nm using a Synergy HT multi-well plate reader (BioTek, Winooski, VT, USA) and the results were expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/g of soluble fraction.

### 2.9. Identification of bioactive peptides by nanoUPLC-ESI-MS/MS

The proteomic analysis of the most active soluble fraction collected by size exclusion chromatography from LPHS was performed in the Proteomics and Genomics Facility (CIB-CSIC) by nanoUPLC-ESI-MS/MS, following the method previously described by García-Mora et al. (2017). Briefly, the most active fraction was purified using a C18 ZipTip reverse phase column (Millipore) and injected in the linear trap quadrupole Orbitrap Velos (Fisher Scientific). Peptides were separated in a AcclaimPepMap C18 column (inner diameter 75 µm, 15 cm long, 3 µm particle size) (Fisher Scientific) and eluted using a solvent gradient at a flow rate of 250 nL/min on a nanoEasy high-performance liquid chromatography coupled to a nanoelectrospray ion source (Fisher Scientific). The mobile phases used consisted of 0.1% formic acid/2% acetonitrile (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B).

Proteome Discoverer 1.4.1.14 (Fisher Scientific) with MASCOT 2.3 was used to search the *Lens culinaris* database (NCBI 427 sequences). Database search parameters used were the following: the cysteine carbamidomethylation and methionine oxidation were established as fixed modifications; precursor ion tolerance, 10 ppm; fragment ion tolerance, 0.5 Da. Peptide sequences identification was validated through Percolator's algorithm using q-value ≤ 0.01.

### 2.10. Determination of ACE inhibitory activity

The ACE inhibitory activity of soluble fractions obtained from lentil processed by LP, HS and LPHS, in those sub-fractions obtained from LPHS sample (F1-F5) as well as in LPHS soluble fraction subjected to simulated gastrointestinal digestion (0.3 mg/mL final concentration) was determined according to a previously reported method (García-Mora et al., 2014). Fluorescence was read every minute for 30 min at emission and excitation wavelengths of 335 and 405 nm, respectively, in a microplate reader Synergy HT (BioTek). The results are expressed as percent inhibition relative to the negative control having 100% enzymatic activity. All samples were analyzed in duplicate. IC<sub>50</sub> values (concentration of sample in mg/mL that inhibits 50% of the ACE activity) were calculated plotting the non-linear regression sigmoidal dose-response curves in GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

### 2.11. Determination of α-glucosidase inhibitory activity

The α-glucosidase inhibitory activity of lentil samples (1.7 mg/mL final concentration) was evaluated according to Vilcacundo, Martínez-Villaluenga, & Hernández-Ledesma (2017). Glucose concentration in the reaction mixtures was measured using the Amplex® Red glucose/glucose oxidase assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Absorbance was measured using a Synergy HT plate reader (BioTek) at 560 nm. Glucose concentration was calculated using a linear standard curve (0–200 µM) from a freshly prepared 400 mM stock solution. All samples

were analyzed in duplicate. Percent inhibition of sucrase and maltase activity of intestinal  $\alpha$ -glucosidase in the presence of lentil samples was calculated relative to the negative control having 100% enzyme activity.

### 2.12. Analysis of oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

Radical scavenging activity of lentil samples was determined by fluorescence using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay previously reported (García-Mora et al., 2017). Fluorescence was measured in a Synergy HT microplate reader (BioTek) at emission and excitation wavelengths of 520 nm and 485 nm, respectively. A Trolox standard curve with a linear concentration range (0–160  $\mu$ M) was prepared from a freshly made 1 mM stock solution. All samples were analyzed in duplicate. Results were expressed as mM of Trolox Equivalents (TE)/g of soluble fraction.

### 2.13. Determination of the potential protective activity of lentil samples against intracellular reactive oxygen species (ROS) production

Murine macrophage cell line RAW 264.7 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) was maintained in Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM) (Lonza, Madrid, Spain) supplemented with 10% fetal bovine serum (Lonza) and 1% penicillin/streptomycin (5000 U/mL, Lonza) at 37 °C in a humidified incubator containing 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. Cell viability was determined using Cell titer 96 Aqueous One Solution assay kit (Promega, Madison, WI, USA). A non-toxic and physiological dose of 0.1 mg/mL was used to evaluate the potential protective activity of lentil samples. Intracellular ROS were measured by the dichlorofluorescein assay as previously reported (Martín, Cordero-Herrera, Bravo, Ramos, & Goya, 2014). Macrophages ( $2 \times 10^5$  cells/well) were pre-treated with lentil samples (0.1 mg/mL final concentration) dissolved in serum-free medium for 20 h. Cells were washed with PBS and incubated with 20  $\mu$ M 2,7-dichlorofluorescein diacetate for 30 min. Then, cells were washed with PBS and treated with serum-free medium containing 2.5 mM *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH). ROS production was monitored for 3 h by fluorescence at an excitation and emission wavelengths of 485 nm and 530 nm, respectively, using a Synergy HT plate reader (BioTek). Control cells with and without *t*-BOOH treatment were used as positive and negative controls, respectively. All samples were analyzed in duplicate. The results were expressed as percentage inhibition of ROS generation relative to *t*-BOOH-stressed cells.

### 2.14. Statistical analysis

Experimental data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation of two replicates analyzed in duplicate. One-way analysis of variance (ANOVA) using the Duncan test was employed to compare the means. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ . All statistical analyses were performed using Statgraphics Plus software, version 5.1. (Statistical Graphics Corp., Rockville, USA).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Influence of processing on peptide, total and individual phenolic contents of lentil flour soluble fraction

The impact of hydrolysis with Savinase (HS), fermentation with *L. plantarum* (LP) and the combination of both treatments (LPHS) on the peptide concentration of lentil soluble fraction is shown in Table 1. All the processing technologies assayed led to a significant increase ( $p < 0.05$ ) of peptides concentration compared to soluble fraction of unprocessed lentil (control sample). The extent of peptides release in LP was significantly lower ( $p < 0.05$ ) than that observed for HS and LPHS, indicating that Savinase was the main responsible for liberation

of peptides in LPHS. Previous studies performed by our group have demonstrated the higher ability of Savinase in releasing peptides from lentil proteins compared to other food grade enzymes (García-Mora et al., 2014; García-Mora, Frias, et al., 2015; García-Mora, Peñas, et al., 2015). The lower production of lentil peptides by *L. plantarum* CECT 748 compared to the other treatments can be explained by the absence of the gene encoding the cell-wall bound proteinase (PrTP), involved in the hydrolysis of proteins to oligopeptides in the genome of this lactic acid bacterium (Liu, Bayjanov, Renckens, Nauta, & Siezen, 2010). However, *L. plantarum* produces peptide transporters and a wide range of intracellular peptidases that confer it the ability to grow and hydrolyse legume proteins, generating bioactive peptides, as it has been previously reported (Bautista-Expósito, Peñas, Dueñas, et al., 2018; Bautista-Expósito, Peñas, Silván, et al., 2018; Jakubczyk et al., 2017; Limón et al., 2015). Hence, it might be expected that the addition of Savinase, causing the hydrolysis of legume proteins to oligopeptides, would improve *L. plantarum* growth and release of peptides during lentil fermentation, as it has been observed in LPHS sample.

Hydrolysis, fermentation and the combination of both processing technologies have a noticeable influence on the phenolic content and composition of lentil soluble fraction (Table 1). Control lentil showed a concentration of total phenolic compounds, calculated as the sum of the contents of individual phenolic compounds, of 921  $\mu$ g/g, concentration in the range of that recently reported for different lentil varieties (Bubelová, Sumczynski, & Salek, 2018). Flavonols, mainly kaempferol dirutinoside and flavan-3-ols such as (+)-catechin-3-*O*-hexoside and procyanidin dimer, were the major phenolic groups constituting more than 90% of total phenolic compounds, followed by hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids (6% of total phenolic compounds). This phenolic composition is similar to that previously found in different lentil cultivars (López et al., 2017; Zhang et al., 2017), where flavonoids were identified as the main extractable phenolic compounds.

After processing, the total phenolic content strongly decreased (31–35% reduction), regardless of the type of processing technology applied. No significant ( $p > 0.05$ ) differences in the total phenolic concentration among HS, LP and LPHS samples were observed. The reduction of total phenolic content in processed lentil can be ascribed mainly to the decrease in flavan-3-ols concentration. Earlier studies have shown that the stability of flavan-3-ol monomers and dimers is pH dependent, and they are unstable and are degraded almost completely within few hours at pH  $> 6$  (Albuquerque, Prieto, Barros, & Ferreira, 2017; Ho, Thoo, Young, & Siow, 2017; Li, Taylor, Ferruzzi, & Mauer, 2012; Zhu et al., 2002). The loss of flavan-3-ols during the course of hydrolysis, fermentation or combined treatments at pH = 6.8 may explain its lower content in processed lentil soluble fractions. Moreover, metabolic activity of *L. plantarum* may be contributing to the reduction of flavan-3-ols and phenolic acids in lentil subjected to fermentation or combined treatments. Savinase exhibits protease and esterase activities and this protease has been shown to cause the release of phenolic compounds linked to cell wall and other food matrix components in legumes at alkaline pH (García-Mora, Frias, et al., 2015; García-Mora, Peñas, et al., 2015; Bautista-Expósito, Peñas, Dueñas, et al., 2018). The reduction in the content of extractable phenolic compounds after Savinase hydrolysis can be explained by the lower pH used in the present work that is not the optimal pH for Savinase activity. Interestingly, HS, LP and LPHS exhibited higher content of *p*-hydroxybenzoic acid and flavonols in the soluble fraction than non-processed lentil that can be partially due to the low degradation of these compounds during processing. Moreover, the esterase activity of Savinase and the production of extracellular esterases by *L. plantarum* (Munoz et al., 2017) could be contributing to the increase of *p*-hydroxybenzoic acid and flavonols, results in consonance with the observations of Kwaw et al. (2018) and García-Mora, Frias, et al. (2015), García-Mora, Peñas, et al. (2015), who reported an increase of flavonol concentration after *L. plantarum* mulberry juice fermentation and lentil flour proteolysis with Savinase, respectively. Furthermore, the phenolic content and composition of LP

**Table 1**Content of peptides (mg/g), total and individual phenolic compounds ( $\mu\text{g/g}$ ) of soluble fraction obtained from control and processed lentil flour (HS, LP, LPHS).

Compounds	Lentil treatments			
	Control	HS	LP	LPHS
Peptides	55.65 $\pm$ 2.66 <sup>a</sup>	192.72 $\pm$ 7.94 <sup>d</sup>	68.80 $\pm$ 4.01 <sup>b</sup>	180.19 $\pm$ 7.63 <sup>c</sup>
<i>Individual phenolic compounds</i>				
Dimer Prodelphinidin (I)	75.31 $\pm$ 2.92 <sup>a</sup>	nd	nd	t
Dimer Prodelphinidin (II)	5.60 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	43.15 $\pm$ 1.23 <sup>b</sup>	t	t
(+)-catechin -3-O-hexoside	184.57 $\pm$ 10.33 <sup>c</sup>	20.51 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	t	5.36 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>
Dimer Procyanidin	108.06 $\pm$ 6.41 <sup>a</sup>	nd	t	t
(+)-catechin	27.59 $\pm$ 3.14 <sup>b</sup>	t	46.01 $\pm$ 1.27 <sup>c</sup>	15.25 $\pm$ 2.30 <sup>a</sup>
<i>trans-p-coumaric acid derivative</i>	9.83 $\pm$ 0.60 <sup>b</sup>	1.77 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	t	t
<i>trans-p-coumaric acid</i>	37.23 $\pm$ 2.69 <sup>a</sup>	nd	nd	nd
<i>p-hydroxybenzoic acid</i>	4.83 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	27.49 $\pm$ 0.99 <sup>b</sup>	28.19 $\pm$ 0.99 <sup>b</sup>	39.28 $\pm$ 3.12 <sup>c</sup>
Vanillic acid	t	t	13.27 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	t
Kaempferol dirutinoside	371.97 $\pm$ 25.20 <sup>a</sup>	453.98 $\pm$ 15.97 <sup>b</sup>	429.74 $\pm$ 2.77 <sup>b</sup>	456.83 $\pm$ 9.22 <sup>b</sup>
Kaempferol rhamnoside-dihexoside	40.87 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>	37.91 $\pm$ 2.99 <sup>a</sup>	52.77 $\pm$ 0.79 <sup>b</sup>	39.81 $\pm$ 1.62 <sup>a</sup>
Isorhamnetin glucuronide	5.16 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup>	6.39 $\pm$ 0.45 <sup>ab</sup>	7.75 $\pm$ 1.00 <sup>bc</sup>	8.50 $\pm$ 1.01 <sup>c</sup>
Kaempferol rhamnoside-dihexoside	14.28 $\pm$ 1.28 <sup>b</sup>	4.75 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	12.09 $\pm$ 2.35 <sup>b</sup>	12.99 $\pm$ 1.52 <sup>b</sup>
Kaempferol hexoside-dirhamnoside (I)	27.12 $\pm$ 1.67 <sup>c</sup>	10.38 $\pm$ 1.42 <sup>a</sup>	nd	17.18 $\pm$ 0.59 <sup>b</sup>
Kaempferol hexoside-dirhamnoside (II)	9.36 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	24.77 $\pm$ 1.76 <sup>b</sup>	10.37 $\pm$ 2.37 <sup>a</sup>	34.16 $\pm$ 0.18 <sup>c</sup>
Total identified phenolic compounds	921.12 $\pm$ 42.91 <sup>b</sup>	600.18 $\pm$ 3.42 <sup>a</sup>	631.10 $\pm$ 41.20 <sup>a</sup>	629.35 $\pm$ 19.94 <sup>a</sup>

Data are the mean  $\pm$  standard deviation of three replicates analyzed in duplicate. Different lowercase letters indicate statistical differences among treatments ( $p < 0.05$ , Duncan's test). HS: enzymatic hydrolysis with Savinase 16 L; LP: fermentation with *L. plantarum* CECT 748; LPHS: fermentation with *L. plantarum* CECT 748 combined with enzymatic hydrolysis with Savinase 16 L; t: traces; nd: not detected.

and LPHS were rather similar, indicating that *L. plantarum* fermentation contributed to the phenolic profile of LPHS in higher extent than Savinase hydrolysis.

### 3.2. Influence of processing on biological activity of lentil flour soluble fraction

Table 2 summarizes the different biological activities evaluated in lentil flour processed by hydrolysis, fermentation or combination of both treatments.

ACE, an enzyme widespread in human body, plays a major role in regulating blood pressure (Nishimura, 2017). The search of food inhibitors of this enzyme as an effective approach for the management of arterial hypertension and cardiovascular diseases has been intensified in the last years.

Results of this study show that processing substantially enhanced the ACE inhibitory activity of lentil soluble fraction from 81% in non-processed lentil to 93–95% in treated lentil samples. No significant differences ( $p > 0.05$ ) in ACE inhibition percentages between HS, LP and LPHS were observed. HS soluble fraction showed quite similar  $\text{IC}_{50}$  value than unprocessed lentil, while LP and LPHS exhibited significant

( $p < 0.05$ ) lower  $\text{IC}_{50}$  values than HS. No significant differences ( $p > 0.05$ ) in  $\text{IC}_{50}$  values between LP and LPHS samples were found, indicating that *L. plantarum* was the main contributor to the *in vitro* antihypertensive activity of LPHS sample. Bioactive peptides and phenolics, mainly flavonoids and phenolic acids, have been proposed as the main compounds involved in ACE inhibitory activity of lentils (García-Mora et al., 2017; Mamilla & Mishra, 2017). The increase in the content of flavonols and *p*-hydroxybenzoic acid after *L. plantarum* fermentation may partially explain the increase of ACE inhibitory activity found in LP and LPHS samples. In addition, *L. plantarum* has demonstrated the ability to produce ACE inhibitory peptides during fermentation of diverse legumes (Jakubczyk et al., 2017; Jakubczyk, Karaś, Baraniak, & Pietrzak, 2013). The formation of these peptides during lentil fermentation could be also involved in the ACE inhibitory activity of LP and LPHS found in the present work. As indicated before, several studies have shown that Savinase efficiently releases peptides with potent ACE inhibitory activity from legumes at alkaline pH. However, the pH used in the present work, lower than the optimal pH for the activity of this protease, could be limiting its activity and therefore, its contribution to potential antihypertensive activity of LP and LPHS samples might be reduced. In fact, lentil flour hydrolyzed by Savinase at pH = 8 or

**Table 2**

Bioactivity of soluble fraction obtained from control and processed lentil flour (HS, LP and LPHS), including: ACE-inhibitory activity expressed as percentage of inhibition relative to the control assay and  $\text{IC}_{50}$  in mg/mL. Intestinal  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity expressed as percentage of inhibition of sucrase and maltase activities relative to the control assay. ORAC expressed in mM TE/g. Chemoprotective activity against oxidative stress expressed as percentage reduction of ROS generation relative to *t*-BOOH-stressed RAW 264.7 macrophages.

Bioactivity	Lentil treatments			
	Control	HS	LP	LPHS
ACE inhibition (%)	81.19 $\pm$ 6.23 <sup>a</sup>	93.05 $\pm$ 1.82 <sup>b</sup>	94.06 $\pm$ 0.66 <sup>b</sup>	95.43 $\pm$ 2.14 <sup>b</sup>
ACE inhibition ( $\text{IC}_{50}$ , mg/mL)	0.44 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.47 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.38 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
$\alpha$ -glucosidase inhibition (%)				
Sucrase activity	75.47 $\pm$ 4.56 <sup>d</sup>	32.74 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	24.36 $\pm$ 1.77 <sup>a</sup>	40.55 $\pm$ 2.50 <sup>c</sup>
Maltase activity	nd	18.91 $\pm$ 1.22 <sup>a</sup>	22.78 $\pm$ 3.40 <sup>ab</sup>	25.03 $\pm$ 1.18 <sup>b</sup>
ORAC (mM TE/g)	309.76 $\pm$ 23.32 <sup>b</sup>	387.39 $\pm$ 24.09 <sup>c</sup>	215.78 $\pm$ 12.31 <sup>a</sup>	400.74 $\pm$ 35.35 <sup>c</sup>
Inhibition of ROS generation (%)	nd	29.66 $\pm$ 2.15 <sup>b</sup>	4.79 $\pm$ 2.84 <sup>a</sup>	28.75 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>

Data are the mean  $\pm$  standard deviation of three replicates analyzed in duplicate. Different lower case letters indicate statistical differences among experimental groups ( $p < 0.05$ , Duncan's test). HS: enzymatic hydrolysis with Savinase 16 L; LP: fermentation with *L. plantarum* CECT 748; LPHS: fermentation with *L. plantarum* CECT 748 combined with enzymatic hydrolysis with Savinase 16 L; nd: not detected.

subjected to LPHS treatment at pH = 8.5 showed lower IC<sub>50</sub> values (0.18 and 0.14 mg/mL, respectively) (Bautista-Expósito, Peñas, Dueñas, et al., 2018; Garcia-Mora et al., 2014) than those found in the present work for LP and LPHS samples, confirming the restricted role of Savinase in the ACE inhibitory activity in the present study.

Intestinal brush-border  $\alpha$ -glucosidase enzymes, consisting in the complexes maltase-glucoamylase (MGAM) and sucrose-isomaltase (SI), are involved in the degradation of disaccharides into simpler sugars that are readily available for intestinal absorption (Simsek, Quezada-Calvillo, Nichols, & Hamaker, 2017). Hence, the inhibition of these enzymes by food compounds could be an economic strategy to control the post-prandial glycaemia, and consequently, to prevent type-2 diabetes.

Both  $\alpha$ -glucosidase complexes consist of two catalytic subunits with different  $\alpha$ -glucosidic catalytic properties or different substrates: MGAM has  $\alpha$ -1,4-glucosidase activity and contributes to digestion of maltose and maltooligosaccharides, while SI with  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,4, and  $\alpha$ -1,6 activities can hydrolyze sucrose, maltose, isomaltose and maltooligosaccharides (Amiri & Naim, 2017). In the present work, we have evaluated the selective inhibitory potential of processed lentil samples for individual subunits of both  $\alpha$ -glucosidase complexes, by using maltose and sucrose as substrates. Soluble fraction obtained from control lentil was able to selectively inhibit sucrase activity (75% inhibition), but inhibition of maltase activity was not observed (Table 2). Dietary phenolic compounds have been found to cause selective inhibition of intestinal  $\alpha$ -glucosidases subunits (Simsek et al., 2017). Flavonols as kaempferol and quercetin glycosides have been suggested as the major contributors to the inhibitory activity of  $\alpha$ -glucosidase in lentil (Zhang et al., 2015). In fact, flavonols are the main compounds in lentil soluble fraction (Table 1) that could explain its high inhibitory activity on  $\alpha$ -glucosidase. Moreover, Simsek et al. (2017) found that (+)-catechin presented higher inhibition of one of the catalytic subunits of SI than those of MGAM, results in agreement with the selective inhibition of sucrase activity by control lentil soluble fraction that contain this phenolic compound (27.5  $\mu$ g/g).

Processing caused a significant reduction ( $p < 0.05$ ) of  $\alpha$ -glucosidase inhibition when sucrose was used as substrate (Table 2). The reduction of the content of some individuals phenolic compounds in lentil soluble fraction caused by processing such as (+) catechin and *p*-coumaric acid, which has been also described as potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors (Pradeep & Sreerama, 2018), could explain the reduction in the sucrase inhibitory activity observed in HS, LP and LPHS samples. On the contrary, processing led to a strong increase of the inhibitory maltase activity of lentil soluble fraction, and LPHS showed the highest inhibitory potential for this enzyme. The enhancement of flavonols content during hydrolysis, fermentation and combination of both treatments could be related with the higher maltase inhibitory activity observed, since earlier studies have reported that flavonols exhibited specific inhibitory activity on duodenal maltase (Fontana Pereira et al., 2011; Şöhretoğlu et al., 2018). Among processed samples, LPHS presented the highest inhibitory potency against sucrase and maltase enzymes, suggesting that both *L. plantarum* fermentation and Savinase proteolysis contributed to the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase in this sample. Since Savinase caused significant higher release of peptides than *L. plantarum*, it can be hypothesized that some bioactive peptides produced by this protease are contributing to the inhibition of intestinal  $\alpha$ -glucosidase in LPHS. This hypothesis is strengthened by the fact that several bioactive peptides formed during legume proteolysis has been found to inhibit this intestinal enzyme (Mojica, Luna-Vital, & González de Mejía, 2017). However, a possible contributing role of peptides released by *L. plantarum* in  $\alpha$ -glucosidase inhibition by LP and LPHS samples cannot be ruled out since a previous study has shown the release of peptides with strong inhibitory activity against these enzymes from beans fermented with this lactic-acid species (Jakubczyk et al., 2017). In the view of the results obtained, it is evident that LPHS exhibited higher inhibitory potency than HS and LP against both  $\alpha$ -

glucosidases, suggesting that the combination of hydrolysis and fermentation could be a useful approach to obtain lentil ingredients aimed at the management of hyperglycemia. Moreover, HS was the most important contributor to the inhibitory effects of LPHS against SI, while the inhibitory activity of LPHS against MGAM can be mainly attributed to *L. plantarum*.

There is accumulative scientific evidence showing that oxidative stress, a state defined by elevated reactive oxygen species (ROS) levels, plays an important role in MetS development (Elnakish, Hassanain, Janssen, Angelos, & Khan, 2013). The antioxidant activity of processed lentil samples has been evaluated by ORAC assay and by the inhibition of ROS generation in RAW 264.7 macrophage cell cultures. ORAC assay measures the inhibition ability against the peroxy radical-induced oxidation. As the peroxy radical is the predominant initiating radical found in food systems, ORAC values are important indicators of food antioxidant activity (Xu, Jin, Peckrul, & Chen, 2018). Soluble fraction from non-processed lentil showed an antioxidant activity of 309.76 mM TE/g (Table 2), value in the line that those previously reported by extractable lentil fraction from different cultivars (Garcia-Mora, Frias, et al., 2015; Garcia-Mora, Peñas, et al., 2015; Padhi, Liu, Hernandez, Tsao, & Ramdath, 2017). This ORAC value could be linked to the abundant presence of (+)-catechin, trans *p*-coumaric acid, glycosides of flavonols or flavones, that have been suggested to be the main responsible for the antioxidant activity of pulses (Oomah, Caspar, Malcolmson, & Bellido, 2011; Zhang et al., 2015). However, the lack of a complete correlation between the content of total phenolic compounds and the antioxidant activity of pulses has been previously reported (Giusti, Caprioli, Ricciutelli, Vittori, & Sagratini, 2017; Zhang et al., 2015).

HS and LPHS showed significant ( $p \leq 0.05$ ) higher ORAC values than non-processed lentil. On the contrary, LP exhibited lower antioxidant capacity than non-processed lentil. In a previous study, it has been demonstrated that Savinase released antioxidant peptides of low molecular weight ( $< 3$  kDa) (Garcia-Mora, Peñas, Frias, & Martínez-Villaluenga, 2014). Since no significant differences in antioxidant activity between HS and LPHS were found, it can be suggested that antioxidant peptides produced by Savinase proteolysis from lentil soluble fraction were the most important contributors to the antioxidant activity of HS and LPHS samples. *L. plantarum* fermentation has been reported to increase the antioxidant activity of pulses either by increasing soluble phenolic compounds content or by releasing antioxidant peptides (Starzyńska-Janiszewska, Stodolak, & Mickowska, 2014; Torino et al., 2013). However, the different fermentation time and pH used in the present work could explain the reduction of antioxidant capacity of lentil soluble fraction after *L. plantarum* fermentation.

The protective role of soluble fractions obtained from non-processed and processed lentil against *t*-BOOH-induced oxidative damage was studied in RAW 264.7 macrophages. It was observed that the pre-treatment of macrophage cultures with control lentil soluble fraction did not offer protection against oxidative damage stimulated by *t*-BOOH (Table 2). This finding does not match with the high chemical-based antioxidant activity determined by the ORAC assay, reflecting the fact that results from cellular and chemical analysis are not always completely correlated. Processing caused a notable increment of inhibition percentage of ROS production in stressed macrophages. HS and LPHS exerted significant ( $p < 0.05$ ) higher protection against oxidative damage than LP, and no significant differences ( $p > 0.05$ ) between both samples were observed, results that showed similar trend to that observed by the ORAC method. The hydrolysis of some complex phenolic compounds to simpler and biologically active compounds by *L. plantarum* (Rodríguez et al., 2009) could explain its greater inhibitory capability against ROS production compared to control lentil. Since HS, LP and LPHS showed similar content of soluble phenolic compounds and taking into account that the phenolic composition of LPHS sample was more similar to LP than HS (Table 1), the higher cytoprotective

**Table 3**

Recovery (%), content of peptides (mg/g) and total phenolic compounds (mg GAE/g), ACE-inhibitory activity (%),  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity (%) and antioxidant activity measured by ORAC assay (mM TE/g) and as inhibition of ROS generation (%) in *t*-BOOH-stressed RAW 264.7 macrophages of F1-F5 fractions collected from LPHS by size exclusion chromatography.

	F1	F2	F3	F4	F5
Recovery (% of LPHS total weight)	12.76 $\pm$ 0.89	23.16 $\pm$ 1.72	35.15 $\pm$ 2.34	22.26 $\pm$ 2.34	6.67 $\pm$ 1.46
Peptides	759.66 $\pm$ 21.99 <sup>e</sup>	423.13 $\pm$ 13.57 <sup>d</sup>	75.20 $\pm$ 3.20 <sup>a</sup>	59.09 $\pm$ 2.00 <sup>a</sup>	267.83 $\pm$ 11.03 <sup>c</sup>
Phenolics	69.63 $\pm$ 0.96 <sup>c</sup>	44.23 $\pm$ 2.74 <sup>d</sup>	16.22 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	6.55 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	11.77 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
ACE inhibition	96.00 $\pm$ 0.70 <sup>b</sup>	96.18 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	nd	nd	nd
$\alpha$ -glucosidase inhibition					
Sucrase activity	nd	5.14 $\pm$ 2.34 <sup>b</sup>	4.45 $\pm$ 0.98 <sup>b</sup>	3.27 $\pm$ 1.75 <sup>ab</sup>	17.68 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>
Maltase activity	45.96 $\pm$ 1.09 <sup>bc</sup>	43.64 $\pm$ 1.23 <sup>b</sup>	44.87 $\pm$ 0.82 <sup>bc</sup>	46.69 $\pm$ 3.42 <sup>bc</sup>	49.01 $\pm$ 2.74 <sup>c</sup>
ORAC	575.50 $\pm$ 29.77 <sup>c</sup>	364.36 $\pm$ 29.16 <sup>c</sup>	104.21 $\pm$ 6.26 <sup>a</sup>	83.83 $\pm$ 6.68 <sup>a</sup>	325.75 $\pm$ 26.87 <sup>b</sup>
Inhibition of ROS generation	9.91 $\pm$ 1.27 <sup>a</sup>	15.08 $\pm$ 3.61 <sup>ab</sup>	27.36 $\pm$ 5.90 <sup>c</sup>	20.18 $\pm$ 2.64 <sup>b</sup>	27.68 $\pm$ 5.76 <sup>c</sup>

Data are the mean  $\pm$  standard deviation of three replicates analyzed in duplicate. Different lowercase letters indicate statistical differences among fractions ( $p < 0.05$ , Duncan's test). LPHS: fermentation with *L. plantarum* CECT 748 combined with enzymatic hydrolysis with Savinase 16 L.; nd: not detected.

potential against oxidative damage of HS and LPHS cannot be attributed to phenolics. Keeping in mind that both samples exhibited similar peptide concentration and that Savinase is able to release peptides with peroxyl radical scavenging activity from lentil, it may be thought that antioxidant peptides released by Savinase hydrolysis provide the ability to HS and LPHS samples to inhibit ROS production in *t*-BOOH treated macrophages.

### 3.3. Fractionation of LPHS and characterization of the bioactive potential of the fractions

LPHS sample was fractionated in 5 fractions (F1-F5), and the content of peptides and phenolic compounds, as well as the biological activity of each fraction was studied. The results are summarized in Table 3. F1-F5 fractions represented 12.76%, 23.16%, 35.15%, 22.26% and 6.67% of the total weight of LPHS, respectively. As it can be observed, all fractions showed different content of bioactive compounds and biological activities. Only fractions F1 and F2 exerted inhibitory activity against ACE and F1 did not exhibit inhibitory potential against sucrase activity. However, all fractions showed inhibitory activity against maltase activity, high ORAC values and inhibition of ROS generation in RAW 264.7 macrophages. F1 was the fraction with the highest content of peptides and phenolics and antioxidant activity, measured by a chemical assay. Furthermore, F1 showed a notable MGAM and ROS inhibitory potential. Due to its higher biological activity, F1 was selected and their peptide and phenolic profile was analyzed by LC-MS/MS.

### 3.4. Characterization of LPHS-F1 peptide profile

Table 4 shows the most abundant peptides identified in the fraction F1 of LPHS sample, that corresponded to peptides with molecular masses within the range 838–1225 Da. These peptides derived from lentil storage proteins vicilin (allergen Len c 1.0102) and convicilin, and also from ADP-glucose pyrophosphorylase, a key regulatory enzyme involved in starch biosynthesis. These peptides contained some amino acid sequences that have been reported as ACE-inhibitors in

**Table 4**

Most abundant peptides identified in fraction F1 collected from LPHS by size exclusion chromatography.

Protein accessions	Sequence	Parent proteins	MH+ (Da)
29,539,111	SDQENPFIFK	Allergen Len c 1.0102	1224.59
164,512,510	HGDPEER	Convicilin	839.37
298,919,408	ATAFGLMK	ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit S2 isoform	838.44

BIOPEP database. It has been reported that ACE-inhibitory peptides are generally short chain peptides with 2–12 amino acids since crystallography studies have found that larger peptides cannot accommodate in the ACE active site (Iwaniak, Minkiewicz, & Darewicz, 2014; Natesh, Schwager, Sturrock, & Acharya, 2003). The C-terminal tripeptide strongly influences the ACE binding of inhibitors. It has been reported that peptides containing hydrophobic (aromatic or branched side-chains) in the C-terminal tripeptide are the most potent ACE inhibitors. Moreover, the presence of C-terminal Phe, Pro, Trp, Tyr, Leu, Ile, Val, and positively charged amino acids residues (Arg or Lys) and N-terminal hydrophobic amino acids with aliphatic chains such as Gly, Ile, Leu, and Val contribute notably to enhance the ACE inhibitory activity of peptides (Daskaya-Dikmen, Yucetepe, Karbancioglu-Guler, Daskaya, & Ozcelik, 2017; Gu & Wu, 2013; Liu, Fang, Min, Liu, & Li, 2018). Some of these structural features are present in the peptides identified in F1 fraction obtained from LPHS. In particular, these peptides showed the presence of Phe, Ile, Arg, Lys or Leu in the C-terminal tripeptide, supporting their potential ACE-inhibitory activity.

Recent studies have given important insight on the structural characteristics of antioxidant peptides, suggesting that the presence of Lys, Trp, Cys, and aromatic amino acids (Phe, His, Tyr and Trp) are important contributors of their radical scavenging capacities (Tian et al., 2015; Yang, Li, Lin, Zhang, & Chen, 2017). Furthermore, the presence of bulky hydrophobic amino acids at C-terminal region or polar/charged amino acids at the C1 position were related with peptide antioxidant activity determined by ORAC assay (Orsini Delgado et al., 2016). Hydrophobic amino acids with low isoelectric point (Ala, Gly, Val and Leu) at N-terminal region also provide high antioxidant activity to peptides (Li, Li, He, & Qian, 2011). Peptides identified in LPHS-F1 fraction contained charged amino acids in C1 position and some bulky amino acids in their sequence. In addition, peptide derived from ADP-glucose pyrophosphorylase exhibited Ala in N-terminus of the sequence. All these structural characteristics suggest the possible antioxidant role of the peptides identified in LPHS-F1. Moreover, they could potentially display  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity since it has been reported that potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides identified up to now contain at least an amino acid with a hydroxyl group side chain (Ser, Thr, Tyr) and/or Pro, Lys, Arg and Met (Ibrahim, Bester, Neitz, & Gaspar, 2018; Zhang et al., 2016). The presence of some of these amino acids (Ser, Thr, Tyr, Lys, Arg) at the N-terminal position or Pro, Met, Ala at the C-terminal region confer highly  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity (Ibrahim et al., 2018). The peptide derived from allergen Len c 1.0102 identified in LPHS-F1 fraction contained Ser at the N-terminal position and also Pro and Lys in its sequence. The other two peptides identified also contained Pro, Ala, Lys, Met or Arg, structural features of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors.

The size and structural features of the peptides contained in LPHS-F1 fraction allow us to postulate that all of them play an important role in the multifunctional activity of this sample.

**Table 5**

Phenolic compounds identified in fraction F1 collected from LPHS soluble fraction by size exclusion chromatography.

Compounds	Concentration ( $\mu\text{g/g}$ )
Dimer Prodelphinidin	0.133 $\pm$ 0.035
(+)-catechin-3-O-hexoside	0.095 $\pm$ 0.034
Kaempferol rutinoside-hexoside	0.510 $\pm$ 0.206
Isorhamnetin glucuronide	0.074 $\pm$ 0.019
Kaempferol rutinoside-rhamnoside (II)	t
Gallic derivative (I)	0.140 $\pm$ 0.033
Gallic derivative (II)	0.124 $\pm$ 0.027

Data are the mean  $\pm$  standard deviation analyzed in triplicate. t: traces. LPHS: fermentation with *L. plantarum* CECT 748 combined with enzymatic hydrolysis with Savinase 16 L.

### 3.5. Characterization of LPHS-F1 phenolic profile

The phenolic content and composition of LPHS-F1 fraction is shown in Table 5. Flavonoids were the most abundant compounds, which accounted for 75% of the total phenolic content, being kaempferol rutinoside-hexoside the major compound detected. The other 25% corresponded to gallic acid derivatives. Flavonoids are potent scavengers of most of the oxidizing molecules, including singlet oxygen and other free radicals (Krishnan et al., 2018). Moreover, it has been reported that gallic acid shows a high inhibitory capacity of LDL-cholesterol oxidation and inhibition of peroxyl and hydroxyl radical induced supercoiled DNA strand (De Camargo, Regitano-D'Arce, Biasoto, & Shahidi, 2014). Zhang et al. (2015) found that kaempferol glycosides and procyanidin dimers play a significant role in the total antioxidant activity of hydrophilic extracts obtained from 20 different lentil cultivars. Furthermore, flavonoids and gallic acid are able to inhibit  $\alpha$ -glucosidase activity (Miao et al., 2018; Šavikin et al., 2018; Wang et al., 2015). In this sense, kaempferol glycosides have been found to be one of the major contributors to  $\alpha$ -glucosidase inhibition in lentil (Zhang et al., 2015), due to the ability of kaempferol to occupy the catalytic center of the enzyme, inducing conformational changes (Peng, Zhang, Liao, & Gong, 2016). The inhibitory effects of oligomeric procyanidins and kaempferol on ACE have also been reported by several authors (Afonso, Passos, Coimbra, Silva, & Soares-da-Silva, 2013; Guerrero et al., 2012). According to all these findings of earlier studies, it can be postulated that the phenolic composition of LPHS-F1 plays a crucial role for its multifunctional activity.

### 3.6. Impact of simulated gastrointestinal digestion on bioaccessible peptides and phenolics and bioactivity of LPHS

*In vitro* gastrointestinal digestion is a useful approach to disclose changes in chemical composition, bioactivity and bioaccessibility of food compounds. Therefore, we evaluated the influence of simulated gastrointestinal digestion on the composition and bioactivity of LPHS sample (Table 6). As it can be observed, *in vitro* digestion enhanced more than 3-fold and 6-fold the peptide and phenolics contents, respectively. The content of peptides found in the digested sample is significantly higher than that found in LPHS lentil sample obtained at alkaline pH after gastrointestinal digestion (Bautista-Expósito, Peñas, Dueñas, et al., 2018), indicating that mild acidic conditions are more suitable than alkaline conditions for releasing peptides after digestive processes. These findings suggest that new peptides were released by the proteolytic activity of gastric and intestinal enzymes. In addition, as a result of the action of gastrointestinal enzymes, phenolic compounds bound to proteins could be released, increasing its bioaccessibility, as it has been previously reported (Pellegrini et al., 2017).

ACE inhibitory activity of LPHS sample increased significantly ( $p \leq 0.05$ ) after simulated gastrointestinal digestion, as suggested by the lower  $\text{IC}_{50}$  value in the digested sample. This  $\text{IC}_{50}$  value is lower

**Table 6**

Content of peptides (mg/g) and total phenolic compounds (mg GAE/g), ACE-inhibitory activity ( $\text{IC}_{50}$ , mg/mL),  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity (%) and antioxidant activity measured by ORAC assay (mM TE/g) of LPHS soluble fraction before and after gastrointestinal digestion by size exclusion chromatography.

	Non-digested LPHS	Digested LPHS
Peptides	180.19 $\pm$ 7.63 <sup>a</sup>	653.58 $\pm$ 46.32 <sup>b</sup>
Phenolics	49.72 $\pm$ 4.20 <sup>a</sup>	299.10 $\pm$ 5.58 <sup>b</sup>
ACE inhibition	0.39 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.19 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
$\alpha$ -glucosidase inhibition		
Sucrase activity	40.55 $\pm$ 2.50 <sup>b</sup>	28.02 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>
Maltase activity	25.03 $\pm$ 1.18 <sup>b</sup>	nd
Antioxidant activity	400.74 $\pm$ 35.35 <sup>a</sup>	762.53 $\pm$ 36.00 <sup>b</sup>

Data are the mean  $\pm$  standard deviation of three replicates analyzed in duplicate. Different lower case letters indicate statistical differences among treatments ( $p < 0.05$ , Duncan's test). LPHS: fermentation with *L. plantarum* CECT 748 combined with enzymatic hydrolysis with Savinase 16 L.; nd: not detected.

than that observed in a LPHS lentil sample obtained at alkaline pH after *in vitro* digestion (Bautista-Expósito, Peñas, Dueñas, et al., 2018). Our results indicate that new peptides with ACE-inhibitory activity may be liberated as consequence of the *in vitro* gastrointestinal digestion, improving the potential antihypertensive properties of LPHS. The increased ACE inhibitory activity observed could be also ascribed to extractable phenolic compounds released during digestive process. On the contrary,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory potency of LPHS for both sucrose and maltose substrates was significantly ( $p \leq 0.05$ ) reduced by simulated gastrointestinal digestion. It can be inferred that some individual phenolic compounds that are able to inhibit these enzymes are degraded upon the effect of digestive enzymes and pH, as it has been recently reported in several vegetables (Burgos-Edwards, Jiménez-Aspee, Thomas-Valdés, Schmeda-Hirschmann, & Theoduloz, 2017; Orqueda et al., 2017). Similarly,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides released by Savinase in LPHS could be hydrolysed during *in vitro* digestion, losing their inhibitory effects against this enzyme.

Digested LPHS sample exhibited an antioxidant activity almost 2-fold higher than undigested sample. These results agree with our previous findings showing that the gastrointestinal digestion of lentil protein hydrolysates obtained with Savinase released smaller peptide fragments and amino acids with higher antioxidant activity than the parent oligopeptides (García-Mora et al., 2014; García-Mora, Frias, et al., 2015; García-Mora, Peñas, et al., 2015; García-Mora et al., 2017). Again, the contribution of free phenolic compounds released by the action of digestive enzymes in the increased antioxidant activity of digested LPHS cannot be ruled out. The antioxidant activity of digested LPHS observed in the present work is 37% higher than that found in digested LPHS lentil at alkaline pH (Bautista-Expósito, Peñas, Dueñas, et al., 2018; Bautista-Expósito, Peñas, Silván, et al., 2018).

The enhancement of most of the biological activities identified in LPHS after gastrointestinal digestion opens new opportunities for the application of lentils subjected to fermentation by lactic acid bacteria in combination with enzymatic hydrolysis by Savinase as a promising ingredient in the development of multifunctional foods. However, additional *in vivo* studies should be conducted in order to confirm the beneficial biological effects of this ingredient in metabolic disturbances associated to MetS.

## 4. Conclusions

Our approach, based on the combination of fermentation with *L. plantarum* CECT 748 and hydrolysis with Savinase 16 L (LPHS), efficiently improved the beneficial health effects of lentil regarding antioxidant, antihypertensive and hypoglycemic properties. These enhanced health-promoting properties of lentil can be attributed to the

action of both Savinase, responsible to the release of bioactive peptides and *L. plantarum* metabolic activity that caused the modification of phenolic compounds profile. Lentil flour subjected to combined hydrolysis-fermentation treatments was fractionated and the fraction with higher biological activity (F1) was selected and characterized. This fraction contained 3 peptides from allergen Len c1, convicilin and ADP-glucose pyrophosphorylase, as well as kaempferol rutinoside-hexoside, prodelfinidin dimer, and gallic acid derivatives as the most important bioactive compounds. This work gives also important insights about the effect of gastrointestinal digestion on the bioactivity of LPHS, confirming the enhancement of bioaccessible peptides and phenolic compounds with antioxidant and ACE inhibitory activities. This study contributes to elucidate the mechanisms of action underlying the demonstrated *in vitro* multifunctional effects related to MetS control of LPHS and provides the basis for further investigating the bioactivity of LPHS *in vivo*. The results could drive the agri-food sector to develop health-enhancing foods using LPHS as multifunctional health-promoting ingredient.

### Declaration of interest

None.

### Ethical statements

I have read and adhere to the publishing ethics of Journal of Functional Foods

### Acknowledgements

The research leading to these results received funding from Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, Spain) and FEDER program (grant number AGL2013-43247-R). E. P. acknowledges to MINECO and European Social Fund for her “Ramón y Cajal” contract.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

- Afonso, J., Passos, C. P., Coimbra, M. A., Silva, C. M., & Soares-da-Silva, P. (2013). Inhibitory effect of phenolic compounds from grape seeds (*Vitis vinifera* L.) on the activity of angiotensin I converting enzyme. *LWT – Food Science and Technology*, *54*, 265–270.
- Albuquerque, B. R., Prieto, M. A., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Assessment of the stability of catechin-enriched extracts obtained from *Arbutus unedo* L. fruits: Kinetic mathematical modeling of pH and temperature properties on powder and solution systems. *Industrial Crops and Products*, *99*, 150–162.
- Alshikh, N., de Camargo, A. C., & Shahidi, F. (2015). Phenolics of selected lentil cultivars: Antioxidant activities and inhibition of low-density lipoprotein and DNA damage. *Journal of Functional Foods*, *18*, 1022–1038.
- Amiri, M., & Naim, H. Y. (2017). Characterization of mucosal disaccharidases from human intestine. *Nutrients*, *9*, 1106.
- Barros, L., Alves, C. T., Dueñas, M., Silva, S., Oliveira, R., Carvalho, A. M., ... Ferreira, I. C. F. R. (2013). Characterization of phenolic compounds in wild medicinal flowers from Portugal by HPLC-DAD-ESI/MS and evaluation of antifungal properties. *Industrial Crops and Products*, *44*, 104–110.
- Bautista-Expósito, S., Peñas, E., Dueñas, M., Silván, J. M., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2018). Individual contributions of Savinase and Lactobacillus plantarum to lentil functionalization during alkaline pH-controlled fermentation. *Food Chemistry*, *257*, 341–349.
- Bautista-Expósito, S., Peñas, E., Silván, J. M., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2018). pH-controlled fermentation in mild alkaline conditions enhances bioactive compounds and functional features of lentil to ameliorate metabolic disturbances. *Food Chemistry*, *248*, 262–271.
- Bubelová, Z., Sumczynski, D., & Salek, R. N. (2018). Effect of cooking and germination on antioxidant activity, total polyphenols and flavonoids, fiber content, and digestibility of lentils (*Lens culinaris* L.). *Journal of Food Processing and Preservation*, *42*, e13388.
- Burgos-Edwards, A., Jiménez-Aspee, F., Thomas-Valdés, S., Schmeda-Hirschmann, G., & Theodulou, C. (2017). Qualitative and quantitative changes in polyphenol composition and bioactivity of *Ribes magellanicum* and *R. punctatum* after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, *237*, 1073–1082.
- Daskaya-Dikmen, C., Yucetepe, A., Karbancioglu-Guler, F., Daskaya, H., & Ozcelik, B. (2017). Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from plants. *Nutrients*, *9*(4), 316.
- De Camargo, A. C., Regitano-D'Arce, M. A. B., Biasoto, A. C. T., & Shahidi, F. (2014). Low molecular weight phenolics of grape juice and winemaking byproducts: Antioxidant activities and inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein cholesterol and DNA strand breakage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(50), 12159–12171.
- Elnakish, M. T., Hassanain, H. H., Janssen, P. M., Angelos, M. G., & Khan, M. (2013). Emerging role of oxidative stress in metabolic syndrome and cardiovascular diseases: Important role of Rac/NADPH oxidase. *Journal of Pathology*, *231*(3), 290–300.
- Fontana Pereira, D., Cazarolli, L. H., Lavado, C., Mengatto, V., Figueiredo, M. S. R. B., Guedes, A., ... Silva, F. R. M. B. (2011). Effects of flavonoids on  $\alpha$ -glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition*, *27*(11–12), 1161–1167.
- García-Mora, P., Frias, J., Peñas, E., Zieliński, H., Giménez-Bastida, J. A., Wiczkowski, W., ... Martínez-Villaluenga, C. (2015). Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) proteins by subtilisins. *Journal of Functional Foods*, *18*, 319–332.
- García-Mora, P., Martín-Martínez, M., Angeles Bonache, M., González-Múñiz, R., Peñas, E., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2017). Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. *Food Chemistry*, *221*, 464–472.
- García-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., Gomez, R., & Martínez-Villaluenga, C. (2015). High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. *Food Chemistry*, *171*, 224–232.
- García-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2014). Savinase, the most suitable enzyme for releasing peptides from lentil (*Lens culinaris* var. Castellana) protein concentrates with multifunctional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(18), 4166–4174.
- Giusti, F., Caprioli, G., Ricciutielli, M., Vittori, S., & Sagratini, G. (2017). Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour. *Food Chemistry*, *221*, 689–697.
- Grosso, G., Marventano, S., Yang, J., Micek, A., Pajak, A., Scalfi, L., ... Kales, S. N. (2017). A comprehensive meta-analysis on evidence of Mediterranean diet and cardiovascular disease: Are individual components equal? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(15), 3218–3232.
- Gu, Y., & Wu, J. (2013). LC-MS/MS coupled with QSAR modeling in characterising of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean proteins. *Food Chemistry*, *141*(3), 2682–2690.
- Guerrero, L., Castillo, J., Quiñones, M., García-Vallvé, S., Arola, L., Pujadas, G., & Mugerza, B. (2012). Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: structure-activity relationship studies. *PLoS One*, *7*(11), e49493.
- Ho, S., Thoo, Y. Y., Young, D. J., & Siow, L. F. (2017). Cyclodextrin encapsulated catechin: Effect of pH, relative humidity and various food models on antioxidant stability. *LWT – Food Science and Technology*, *85*, 232–239.
- Ibrahim, M. A., Bester, M. J., Neitz, A. W. H., & Gaspar, A. R. M. (2018). Structural properties of bioactive peptides with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. *Chemical Biology and Drug Design*, *91*(2), 370–379.
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., & Darewicz, M. (2014). Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(2), 114–134.
- Jakubczyk, A., Karaš, M., Baraniak, B., & Pietrzak, M. (2013). The impact of fermentation and *in vitro* digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from pea proteins. *Food Chemistry*, *141*(4), 3774–3780.
- Jakubczyk, A., Karaš, M., Złotek, U., & Szymanowska, U. (2017). Identification of potential inhibitory peptides of enzymes involved in the metabolic syndrome obtained by simulated gastrointestinal digestion of fermented bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Food Research International*, *100*, 489–496.
- Kapravelou, G., Martínez, R., Andrade, A. M., López Chaves, C., López-Jurado, M., Aranda, P., ... Porres, J. M. (2015). Improvement of the antioxidant and hypolipidaemic effects of cowpea flours (*Vigna unguiculata*) by fermentation: Results of *in vitro* and *in vivo* experiments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*(6), 1207–1216.
- Krishnan, V., Gonthal, S., Dahuja, A., Vinutha, T., Singh, B., Jolly, M., ... Sachdev, A. (2018). Enhanced nutraceutical potential of gamma irradiated black soybean extracts. *Food Chemistry*, *245*, 246–253.
- Kwaw, E., Ma, Y., Tchabo, W., Apalyia, M. T., Wu, M., Sackey, A. S., ... Tahir, H. E. (2018). Effect of lactobacillus strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice. *Food Chemistry*, *250*, 148–154.
- Lí, Y. W., Lí, B., He, J., & Qian, P. (2011). Structure-activity relationship study of anti-oxidative peptides by QSAR modeling: The amino acid next to C-terminus affects the activity. *Journal of Peptide Science*, *17*(6), 454–462.
- Lí, N., Taylor, L. S., Ferruzzi, M. G., & Mauer, L. J. (2012). Kinetic study of catechin stability: Effects of pH, concentration, and temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(51), 12531–12539.
- Limón, R. I., Peñas, E., Torino, M. I., Martínez-Villaluenga, C., Dueñas, M., & Frias, J. (2015). Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extracts. *Food Chemistry*, *172*, 343–352.
- Liu, M., Bayjanov, J. R., Renckens, B., Nauta, A., & Siezen, R. J. (2010). The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: A genomic comparison. *BMC Genomics*, *11*(1), 36.

- Liu, C., Fang, L., Min, W., Liu, J., & Li, H. (2018). Exploration of the molecular interactions between angiotensin-I-converting enzyme (ACE) and the inhibitory peptides derived from hazelnut (*Corylus heterophylla* Fisch.). *Food Chemistry*, *245*, 471–480.
- López, A., El-Naggar, T., Dueñas, M., Ortega, T., Estrella, I., Hernández, T., ... Carretero, M. E. (2017). Influence of Processing in the Phenolic Composition and Health-Promoting Properties of Lentils (*Lens culinaris* L.). *Journal of Food Processing and Preservation*, *41*(5), e13113.
- Mamilla, R. K., & Mishra, V. K. (2017). Effect of germination on antioxidant and ACE inhibitory activities of legumes. *LWT – Food Science and Technology*, *75*, 51–58.
- Martín, M. Á., Cordero-Herrera, I., Bravo, L., Ramos, S., & Goya, L. (2014). Cocoa flavonols show beneficial effects in cultured pancreatic beta cells and liver cells to prevent the onset of type 2 diabetes. *Food Research International*, *63*, 400–408.
- Martínez, R., López-Jurado, M., Wanden-Berghe, C., Sanz-Valero, J., Porres, J. M., & Kapravelou, G. (2016). Beneficial effects of legumes on parameters of the metabolic syndrome: A systematic review of trials in animal models. *British Journal of Nutrition*, *116*(3), 402–424.
- Miao, J., Li, X., Zhao, C., Gao, X., Wang, Y., & Gao, W. (2018). Active compounds, antioxidant activity and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of different varieties of Chaenomeles fruits. *Food Chemistry*, *248*, 330–339.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodtkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, *5*(6), 1113–1124.
- Mojica, L., Luna-Vital, D. A., & González de Mejía, E. (2017). Characterization of peptides from common bean protein isolates and their potential to inhibit markers of type-2 diabetes, hypertension and oxidative stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(8), 2401–2410.
- Muñoz, R., de las Rivas, B., López de Felipe, F., Reverón, I., Santamaría, L., Esteban-Torres, M., ... Landete, J. M. (2017). Biotransformation of phenolics by *Lactobacillus plantarum* in Fermented Foods. In *Fermented foods in health and disease prevention* (pp. 63–83).
- Natesh, R., Schwager, S. L. U., Sturrock, E. D., & Acharya, K. R. (2003). Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature*, *421*(6922), 551–554.
- Nishimura, H. (2017). Renin-angiotensin system in vertebrates: Phylogenetic view of structure and function. *Anatomical Science International*, *92*(2), 215–247.
- Oomah, B. D., Caspar, F., Malcolmson, L. J., & Bellido, A. S. (2011). Phenolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls. *Food Research International*, *44*(1), 436–441.
- Orqueda, M. E., Rivas, M., Zampini, I. C., Alberto, M. R., Torres, S., Cuello, S., ... Isla, M. I. (2017). Chemical and functional characterization of seed, pulp and skin powder from chilito (*Solanum betaceum*), an Argentine native fruit. Phenolic fractions affect key enzymes involved in metabolic syndrome and oxidative stress. *Food Chemistry*, *216*, 70–79.
- Orsini Delgado, M. C., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Añón, M. C., & Tironi, V. A. (2016). Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chemistry*, *197*, 1160–1167.
- Padhi, E. M. T., Liu, R., Hernandez, M., Tsao, R., & Ramdath, D. D. (2017). Total polyphenol content, carotenoid, tocopherol and fatty acid composition of commonly consumed Canadian pulses and their contribution to antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, *38*, 602–611.
- Pellegrini, M., Lucas-Gonzalez, R., Fernández-López, J., Ricci, A., Pérez-Álvarez, J. A., Sterzo, C. L., & Viuda-Martos, M. (2017). Bioaccessibility of polyphenolic compounds of six quinoa seeds during *in vitro* gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, *38*, 77–88.
- Peng, X., Zhang, G., Liao, Y., & Gong, D. (2016). Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on  $\alpha$ -glucosidase. *Food Chemistry*, *190*, 207–215.
- Pradeep, P. M., & Sreerama, Y. N. (2018). Phenolic antioxidants of foxtail and little millet cultivars and their inhibitory effects on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities. *Food Chemistry*, *247*, 46–55.
- Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., de las Rivas, B., de Felipe, F. L., Gómez-Cordovés, C., ... Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *132*(2), 79–90.
- Rodríguez-Monforte, M., Sánchez, E., Barrio, F., Costa, B., & Flores-Mateo, G. (2017). Metabolic syndrome and dietary patterns: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *European Journal of Nutrition*, *56*(3), 925–947.
- Santhekadur, P. K., Kumar, D. P., Seneshaw, M., Mirshahi, F., & Sanyal, A. J. (2017). The multifaceted role of natriuretic peptides in metabolic syndrome. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *92*(Supplement C), 826–835.
- Šavikin, K., Živković, J., Alimpić, A., Zdunić, G., Janković, T., Duletić-Laušević, S., & Menković, N. (2018). Activity guided fractionation of pomegranate extract and its antioxidant, antidiabetic and antineurodegenerative properties. *Industrial Crops and Products*, *113*, 142–149.
- Simsek, M., Quezada-Calvillo, R., Nichols, B. L., & Hamaker, B. R. (2017). Phenolic compounds increase the transcription of mouse intestinal maltase-glucoamylase and sucrose-isomaltase. *Food and Function*, *8*(5), 1915–1924.
- Şöhretoğlu, D., Sari, S., Şoral, M., Barut, B., Özel, A., & Liptaj, T. (2018). Potential of *Potentilla inclinata* and its polyphenolic compounds in  $\alpha$ -glucosidase inhibition: Kinetics and interaction mechanism merged with docking simulations. *International Journal of Biological Macromolecules*, *108*, 81–87.
- Starzyńska-Janiszewska, A., Stodolak, B., & Mickowska, B. (2014). Effect of controlled lactic acid fermentation on selected bioactive and nutritional parameters of tempeh obtained from unhulled common bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(2), 359–366.
- Tian, M., Fang, B., Jiang, L., Guo, H., Cui, J. Y., & Ren, F. (2015). Structure-activity relationship of a series of antioxidant tripeptides derived from  $\beta$ -Lactoglobulin using QSAR modeling. *Dairy Science and Technology*, *95*(4), 451–463.
- Torino, M. I., Limón, R. I., Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C., & Frias, J. (2013). Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry*, *136*(2), 1030–1037.
- Vilcacundo, R., Martínez-Villaluenga, C., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Release of dipeptidyl peptidase IV,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, *35*, 531–539.
- Wang, T., Li, X., Zhou, B., Li, H., Zeng, J., & Gao, W. (2015). Anti-diabetic activity in type 2 diabetic mice and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory, antioxidant and anti-inflammatory potential of chemically profiled pear peel and pulp extracts (*Pyrus* spp.). *Journal of Functional Foods*, *13*, 276–288.
- World Health Organization (2013). *Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013–2020*.
- Xu, M., Jin, Z., Peckrul, A., & Chen, B. (2018). Pulse seed germination improves antioxidative activity of phenolic compounds in stripped soybean oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, *250*, 140–147.
- Yang, R., Li, X., Lin, S., Zhang, Z., & Chen, F. (2017). Identification of novel peptides from 3 to 10 kDa pine nut (*Pinus koraiensis*) meal protein, with an exploration of the relationship between their antioxidant activities and secondary structure. *Food Chemistry*, *219*, 311–320.
- Zhang, B., Deng, Z., Ramdath, D. D., Tang, Y., Chen, P. X., Liu, R., ... Tsao, R. (2015). Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chemistry*, *172*, 862–872.
- Zhang, B., Deng, Z., Tang, Y., Chen, P. X., Liu, R., Dan Ramdath, D., ... Tsao, R. (2017). Bioaccessibility, *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolics in cooked green lentil (*Lens culinaris*). *Journal of Functional Foods*, *32*, 248–255.
- Zhang, Y., Wang, N., Wang, W., Wang, J., Zhu, Z., & Li, X. (2016). Molecular mechanisms of novel peptides from silkworm pupae that inhibit  $\alpha$ -glucosidase. *Peptides*, *76*, 45–50.
- Zhu, Q. Y., Holt, R. R., Lazarus, S. A., Ensuna, J. L., Hammerstone, J. F., Schmitz, H. H., & Keen, C. L. (2002). Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(6), 1700–1705.

#### **4.2. CAPÍTULO 2. Optimización de los parámetros del proceso de fermentación en combinación con la hidrólisis enzimática a pH controlado para maximizar el contenido de compuestos bioactivos y el potencial multifuncional de la fracción soluble de lenteja (publicación 3).**

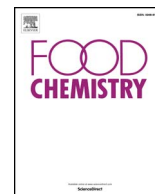
**Publicación 3.** La fermentación a pH controlado en condiciones alcalinas suaves aumenta los compuestos bioactivos y las características funcionales de la lenteja para mejorar las alteraciones metabólicas.

Sara Bautista-Expósito, Elena Peñas, José Manuel Silván, Juana Frias, Cristina Martínez-Villaluenga. pH-controlled fermentation in mild alkaline conditions enhances bioactive compounds and functional features of lentil to ameliorate metabolic disturbances. *Food Chemistry*, 2018, 248: 262-271.

##### RESUMEN

La fermentación de lenteja tiene un potencial prometedor como estrategia para el desarrollo de ingredientes multifuncionales dirigidos al control y prevención del SMet. La metodología de superficie de respuesta (MSR) se aplicó para optimizar el proceso de fermentación de lenteja y estudiar los efectos del pH y el tiempo del proceso en la generación de péptidos, compuestos fenólicos solubles y actividades biológicas. La fermentación con *Lactobacillus plantarum* y Savinasa® 16 L se llevó a cabo a diferentes pHs (6,5-8,5) y tiempos (5,5-30h). Se realizó un análisis de la varianza para evaluar los efectos lineales, cuadráticos y de interacción entre los parámetros de fermentación. El pH afectó positivamente al contenido de péptidos, compuestos fenólicos solubles y actividad antioxidante, mientras que se observó un impacto negativo sobre la actividad inhibidora de la lipasa pancreática ( $p < 0,0001$ ). Así mismo, el tiempo de fermentación mostró un efecto positivo sobre la proteólisis y afectó negativamente a la actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina I (ECA) de la fracción soluble de lenteja ( $p < 0,0001$ ). El máximo contenido de péptidos, compuestos fenólicos solubles y bioactividad global se alcanzaron a pH 8,5 después de 11,6 h. En conclusión, este estudio podría contribuir al desarrollo de ingredientes multifuncionales a partir de lenteja dirigidos al control de SMet.





# pH-controlled fermentation in mild alkaline conditions enhances bioactive compounds and functional features of lentil to ameliorate metabolic disturbances



Sara Bautista-Expósito, Elena Peñas, José Manuel Silván, Juana Frias, Cristina Martínez-Villaluenga\*

Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Lentil  
pH-controlled fermentation  
Peptides  
Phenolic compounds  
Bioactivity  
Metabolic syndrome

## ABSTRACT

Lentil fermentation has a promising potential as a strategy for development of multifunctional ingredients targeting metabolic syndrome (MetS). Response surface methodology was applied to optimize lentil fermentation and study its effects on generation of peptides, soluble phenolics and bioactivities. Fermentation using *Lactobacillus plantarum* and Savinase® 16L was carried out at different pH (6.5–8.5) and times (5.5–30 h). Analysis of variance was performed to evaluate linear, quadratic and interaction effects between fermentation parameters. pH positively affected peptides, soluble phenolic compounds and antioxidant activity whereas a negative impact on lipase inhibitory activity was observed ( $p < .0001$ ). Time showed positive effect on proteolysis and negatively affected angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of fermented lentil ( $p < .0001$ ). Multivariate optimization led to high levels of peptides, soluble phenolics and bioactivity of fermented lentil at pH 8.5 and 11.6 h. In conclusion, this study might contribute to the development of functional ingredients from lentil for MetS management.

## 1. Introduction

The metabolic syndrome (MetS) affects approximately 25% of the world's population (Pistollato & Battino, 2014). It is characterized by the combination of several risk factors for cardiovascular disease and type-2 diabetes, such as hyperglycemia, central obesity, hypertension, insulin resistance and dyslipidemia (Pistollato & Battino, 2014). Moreover, oxidative stress generated by an overproduction of reactive oxygen species has been linked to the promotion of a chronic inflammatory state and the development of MetS (Greene, Huang, Serhan, & Panigrahy, 2011). Therefore, development of multifunctional ingredients targeting all of these metabolic dysfunctions would be desirable for early prevention.

There is an inverse relationship between a diet rich in legumes and the appearance of factors implicated in MetS such as obesity, hypertension, type-2 diabetes mellitus and dyslipidemia (Martínez et al., 2016). These beneficial effects of legumes may be attributed to the presence of bioactive compounds that may act as physiological modulators of metabolism, given that they exhibit antihypertensive,

antioxidant, hypoglycemic, hypocholesterolemic and anti-inflammatory properties (Martínez et al., 2016). Therefore, legumes have a promising potential for industrial application as functional ingredients to tackle the main risk factors associated to MetS.

Lentil (*Lens culinaris* Medik.) is an important pulse crop worldwide, grown in over 70 countries, consumed in more than 100. Lentil is a dietary source of proteins, starch, fiber and micronutrients important to human nutrition (Campos-Vega, Loarca-Piña, & Oomah, 2010). Lentil proteins are precursors of bioactive peptides with antioxidant activity that may also act as inhibitors of angiotensin I converting enzyme (ACE) involved in rising blood pressure (García-Mora et al., 2017). This legume is also a dietary source of phenolic compounds, a group of phytochemicals including flavan-3-ols, proanthocyanidins, flavones, flavonols, stilbenes, phenolic acids, and anthocyanidins (Mirali, Purves, & Vandenberg, 2016). Proanthocyanidins make up the largest proportion of phenolic compounds in lentil and they are mainly bound to polysaccharides and proteins. Recent studies point out the potential role of lentil phenolic compounds in weight management and blood glucose control as these compounds are able to inhibit gastrointestinal

**Abbreviations:** ACE, angiotensin I converting enzyme; ANOVA, analysis of variance; DOE, design of experiment; GAE, gallic acid equivalents; LAB, lactic acid bacteria; LPS, lipopolysaccharide; MetS, metabolic syndrome; MRS, Man Rogosa Sharpe; MW, molecular weight; NO, nitric oxide; ORAC, oxygen radical absorbance capacity; RSM, response surface methodology; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; TE, Trolox equivalents

\* Corresponding author at: C/ Juan de la Cierva, 3 28006, Madrid, Spain.

E-mail address: [c.m.villaluenga@csic.es](mailto:c.m.villaluenga@csic.es) (C. Martínez-Villaluenga).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.059>

Received 6 September 2017; Received in revised form 20 November 2017; Accepted 15 December 2017

Available online 19 December 2017

0308-8146/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

enzymes involved in carbohydrate ( $\alpha$ -glucosidase) and lipid digestion (pancreatic lipase) (Zhang et al., 2015).

Previous studies have demonstrated that lactic acid fermentation with selected starters have potential application for enhancing legume functional features (Kapraevou et al., 2015). Many studies have used *Lactobacillus plantarum* as a starter in legume fermentation as it produces esterases and a wide range of carbohydrases that result in an increased content of free phenolic compounds (Gan, Shah, Wang, Lui, & Corke, 2016) and improved antioxidant, hypolipidemic and anti-hypertensive activities of the fermented product (Kapraevou et al., 2015; Limón et al., 2015; Torino et al., 2013). Despite these advantages, there are still some challenges that need to be faced for the efficient production of bioactive compounds by legume fermentation. Proteolytic activity of lactic acid bacteria (LAB) is low compared to other microorganisms which limits the release of bioactive peptides from legume proteins (Jakubczyk, Karaś, Baraniak, & Pietrzak, 2013). Moreover, it is important to notice that in uncontrolled pH fermentation, acidification by LAB causes protein precipitation and enzymatic inactivation (Liu, Bayjanov, Renckens, Nauta, & Siezen, 2010; Rui et al., 2016) hindering the mobilization of bound phenolics and the production of bioactive peptides. To address these challenges, the aim of this study was to develop an innovative approach that consists of pH-controlled fermentation of lentil flour using *L. plantarum* along with a commercial food grade alkaline protease from *Bacillus subtilis* (Savinase® 16L). The hypothesis of this study is that pH-controlled fermentation of lentil flour using *L. plantarum* and Savinase® 16L enhances proteolysis, production of bioactive peptides, solubilization of phenolic compounds and biological activity of fermented lentil. Response surface methodology (RSM) was used to study the individual and interaction effects of operating parameters (fermentation pH and time) on proteolysis, release of peptides and phenolic compounds as well as the potential health benefits (antihypertensive, hypoglycemic, hypolipidemic, antioxidant and antiinflammatory activities) of the bioaccessible (soluble) fraction of fermented lentil. Moreover, RSM was applied to determine the optimum operating conditions (fermentation pH and time) to improve the content of bioactive compounds and biological activities. The second order polynomial equations (regression models) provided an excellent explanation of the relationship between the response variables and operating parameters.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Lentil (*Lens culinaris* Medik. var. castellana) seeds were purchased from Semillas Iglesias S.A. (Salamanca, Spain) and stored at 4 °C until use. Lentil seeds were milled in a coffee grinder (Moulinex, Allencçon, France) and passed through a 60-mesh sieve with 0.5 mm pore size. The commercial food grade protease Savinase® 16L (16 KNPU/g) was provided by Novozyme (Bagsvaerd, Denmark). *Lactobacillus plantarum* CECT 748 was purchased from the Spanish Type Culture Collection (CECT, Valencia, Spain). Bacterial cultures were propagated using Man Rogosa Sharpe (MRS) broth (Pronadisa, Madrid, Spain) as described previously (Torino et al., 2013) and stored at –80 °C. Enzymes used in biochemical assays including ACE from rabbit lung (EC 3.4.15.1), rat intestine  $\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.20) and porcine pancreatic lipase type II (EC 3.1.1.3) as well as other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) unless otherwise stated.

### 2.2. Fermentation of lentil flour

Cells of *L. plantarum* grown in MRS broth for 5 h at 37 °C were harvested by centrifugation at 8000  $\times$ g for 10 min, washed twice, and suspended in sterile water. Fermentation was carried out in a 3L Bioflo/Celligen 115 bioreactor (Eppendorf Iberica, Madrid, Spain) mixing 1.5L of sterile tap water with lentil flour (143 g/L final

concentration), Savinase (365 mg/L final concentration) and *L. plantarum* ( $2 \times 10^8$  CFU/L final cell density). Fermentation experiments were performed under stirring conditions (300 rpm) at 37 °C, at different pH values and times according to the experimental design described in Section 2.10. Control of pH is maintained by a proportional and integral controller which operates peristaltic pumps, assigned to perform acid or base addition. The pH is sensed by a gel-filled pH probe placed in the bioreactor.

Three independent experiments were conducted for each fermentation condition. Flour suspension without enzyme and bacterial culture was used as control. Soluble fractions were obtained by centrifugation at 7500  $\times$ g at 5 °C for 15 min and they were further heated at 70 °C during 10 min for enzyme inactivation. Finally, samples were freeze-dried and stored under vacuum at –20 °C until further analysis.

### 2.3. Determination of soluble protein, peptide and phenolic content

Soluble protein concentration of samples was quantified by the Detergent Compatible Protein Assay kit (Bio-Rad, Madrid, Spain) using bovine serum albumin as standard (0.1–1.6 mg/mL). Results were expressed as mg of soluble protein/g of soluble fraction.

Peptide concentration of soluble fractions was measured by Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay (Fisher Scientific, Madrid, Spain) in sample permeates obtained by ultrafiltration through cellulose membranes of 10 kDa pore size (Millipore, Madrid, Spain). Results were expressed as mg of peptides/g of soluble fraction.

Total phenolic content of lentil soluble fractions was determined using Folin-Ciocalteu's reagent (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1999). An aliquot of 100  $\mu$ L of diluted sample was mixed with 625  $\mu$ L of distilled water, 250  $\mu$ L of 7.5% (w/v) sodium carbonate and 25  $\mu$ L of 2N Folin-Ciocalteu's phenol reagent. Reaction mixtures were incubated at room temperature for 2 h in darkness. The absorbance was measured at 739 nm using a microplate reader Synergy HT (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) controlled by the Gen 5™ Version 1.1 software (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). A gallic acid standard curve with a linear range (0–225  $\mu$ g/mL) was prepared from a freshly made 1 mg/mL stock solution. Results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/g of soluble fraction.

### 2.4. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Protein profiles of lentil soluble fractions were analyzed by SDS-PAGE. Electrophoresis was carried out loading 20  $\mu$ g of protein/well on NuPAGE® Novex 4–12% Bis-Tris Gels (Invitrogen, Madrid, Spain). Gels were placed in XCell-sure lock Mini-Cell (Invitrogen, Madrid, Spain) and run under reducing conditions at 200 V. NuPAGE® MES-SDS and NuPAGE® LDS (Invitrogen, Madrid, Spain) were used as running and sample buffers, respectively. Gels were stained with SimplyBlue SafeStain (Invitrogen, Madrid, Spain) for 1 h and destained in deionized water for 2 h. The molecular weight of poly- and oligopeptides was determined by comparison with the molecular weight marker Novex® Sharp Prestained Protein Standard (Invitrogen, Madrid, Spain) containing proteins from 3.5 to 260 kDa.

### 2.5. Determination of radical scavenging activity

Radical scavenging activity of lentil soluble fractions was evaluated by fluorescence using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method as described previously (García-Mora et al., 2017). Fluorescence was measured in a microplate reader Synergy HT (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) at emission and excitation wavelengths of 520 nm and 485 nm, respectively. A Trolox standard curve with a linear concentration range (0–160  $\mu$ M) was prepared from a freshly made 1 mM stock solution. Results were expressed as mM of Trolox equivalents (TE)/g of soluble fraction.

## 2.6. ACE inhibitory activity

For ACE inhibitory activity, 3 kDa permeates (0.5 mg/mL final concentration) were assayed following a previously described method (García-Mora, Peñas, Frias, & Martínez-Villaluenga, 2014). Permeates were obtained by ultrafiltration of samples through cellulose membranes of 3 kDa pore size (Millipore, Billerica, MA, USA). Fluorescence was read every minute for 30 min at emission and excitation wavelengths of 335 and 405 nm, respectively, in a microplate reader Synergy HT (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). The results are presented as percent inhibition relative to the negative control having 100% enzymatic activity. IC<sub>50</sub> values (concentration of sample in mg/mL that inhibits 50% of the ACE activity) were calculated for the most active fermented samples plotting the non-linear regression sigmoidal dose-response curves in GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software Inc., San Diego).

## 2.7. $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity

For  $\alpha$ -glucosidase inhibition assay (Vilcacundo, Martínez-Villaluenga, & Hernández-Ledesma, 2017), 100  $\mu$ L of soluble fraction from fermented lentil (1 mg/mL), positive control (1 mM acarbose) or negative control (distilled water) was added to 50  $\mu$ L of rat intestine  $\alpha$ -glucosidase (1 U/mL in 0.1 M maleate buffer pH 6.9). Test tubes were incubated at 37 °C for 5 min. After pre-incubation, 50  $\mu$ L of substrate (20 mM sucrose) was added to each tube. The reaction mixtures were incubated using a thermomixer (Eppendorf Iberica, Madrid, Spain) at 37 °C and a shaking speed of 1000 rpm for 30 min. Finally, reaction was stopped placing the tubes in a 100 °C water bath for 5 min. Supernatants were collected by centrifugation at 20 °C, 12,000  $\times$  g for 5 min and stored at –20 °C until glucose quantification. Glucose concentration of reaction mixtures was determined using the Amplex® Red glucose/glucose oxidase assay kit (Invitrogen, Madrid, Spain). Absorbance was measured using a Synergy HT plate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) at 560 nm. Glucose concentration was calculated using a linear standard curve (0–200  $\mu$ M) from a freshly prepared 400 mM stock solution. Percent inhibition was calculated relative to the negative control having 100% enzymatic activity.

## 2.8. Lipase inhibitory activity

The ability of the fractions to inhibit porcine pancreatic lipase was evaluated using a previously reported method (Kim et al., 2010) with minor modifications. Briefly, 20  $\mu$ L of fermented lentil (2 mg/mL), positive control (10 mM orlistat), or negative control (distilled water) was mixed with 20  $\mu$ L of pancreatic lipase solution (20 mg in 1 mL of 10 mM 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid and 1 mM 2,2',2'',2'''-(ethane-1,2-diylidinitrilo)tetraacetic acid, pH 6.8) and 195  $\mu$ L Tris buffer (100 mM Tris-HCl and 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.0). Test tubes were placed in a thermomixer (Eppendorf Iberica, Madrid, Spain) and incubated at 37 °C for 15 min. The enzymatic reactions were started by addition of 5  $\mu$ L of the substrate solution (10 mM *p*-nitrophenyl butyrate in dimethylsulfoxide) and were incubated at 37 °C for 30 min. Lipase activity was determined by measuring the hydrolysis of *p*-nitrophenyl butyrate to *p*-nitrophenol at 405 nm using a microplate reader Synergy HT (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Percent inhibition was calculated relative to the negative control having 100% enzymatic activity.

## 2.9. Anti-inflammatory activity

### 2.9.1. Cell culture

The murine macrophage cell line RAW 264.7 was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) and cultured in Dulbecco's modified Eagles's medium (Lonza, Madrid, Spain) supplemented with 10% fetal bovine serum (Lonza, Madrid, Spain) and 1% penicillin/streptomycin (5000 U/mL, Lonza, Madrid, Spain). Cells were

plated at densities of  $1 \times 10^6$  cells in 75 cm<sup>2</sup> culture flasks and maintained at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator until 90% confluence. The culture medium was changed every 2 days. Before a confluent monolayer appeared, subculturing cell process was carried out.

### 2.9.2. Cell viability

Cell viability was determined by using the Cell Titer 96® Aqueous One Solution Proliferation Assay kit. RAW264.7 cells were seeded in 96-well plates ( $5 \times 10^4$  cells/well) and allowed to adhere for 24 h. Cells were exposed to serum-free medium containing 0.5 mg/mL of fermented lentil soluble fraction and incubated at 37 °C for 24 h. Control cells (non-treated) were incubated in serum-free medium. After incubation period, the medium was replaced by 100  $\mu$ L of serum-free medium and 20  $\mu$ L of Cell Titer 96®. After 1 h of incubation, absorbance was read at 515 nm in a microplate reader Synergy HT (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). The viability was calculated considering the viability of control cells as 100%.

### 2.9.3. Quantification of nitric oxide (NO)

For inflammatory experiments,  $5 \times 10^4$  cells/well were seeded in a 96-well plate. Nitrite accumulation, and indicator of NO synthesis, was measured in the culture medium of treated and control cells by the Griess reaction (Green et al., 1982). After 24 h of incubation, the medium was removed, cells were washed with 200  $\mu$ L Dulbecco's phosphate buffer saline and treated with 0.5 mg/mL soluble fractions of fermented lentil and 100 ng/mL lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* O55:B5 for 24 h. Control cells were incubated in serum-free medium for 24 h. Finally, cell culture medium was collected and stored at –20 °C for NO quantification. Briefly, 100  $\mu$ L of cell culture medium was plated in 96-well plate and an equal amount of Griess reagent constituted by 1% (w/v) sulfanilamide and 0.1% (w/v) N-1-(naphthyl) ethylenediamine-diHCl in 2.5% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, was added. The plate was incubated for 5 min and the absorbance measured at 550 nm in a Synergy HT microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). The amount of NO was calculated using a sodium nitrite standard curve (0–10  $\mu$ g/mL). Percent inhibition was calculated relative to control cells stimulated with 100 ng/mL LPS.

## 2.10. Experimental design and statistical analysis

A face-centered composite rotational design was employed to investigate the effects of two independent variables (pH and fermentation time) on eight response variables (protein and peptide content, total phenolic content, antioxidant activity, ACE-,  $\alpha$ -glucosidase- and lipase-inhibitory activities, and inhibition of NO production in RAW 264.7 macrophages). RSM was also used to determine the optimum conditions for pH-controlled fermentation of lentil flour. Design of experiment (DOE) function in Statistica v7.0 (Statsoft, CA, USA) was used for experimental design. A two-level-two factor design was applied resulting in 10 experimental runs. The lowest, low, center point, high and highest levels of each variable were coded as  $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+1$  and  $+\alpha$ , respectively (Table 1). In order to correlate the response variable to the independent variables, multiple regression analysis was performed on the data to fit the coefficient of the second-order polynomial model of the response. The correlation between response and the selected factors can be expressed by a quadratic equation [Eq. (1)]:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

where Y represents the response variable,  $\beta_0$  is the intercept, and  $X_i$  and  $X_j$  are the independent variables. The terms  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  and  $\beta_{ij}$  are the regression coefficients of the linear, quadratic and interaction parameters. The adequacy of the models was determined by the coefficient of determination ( $R^2$ ) and adjusted  $R^2$ , the F-test value (F-value) and the

**Table 1**  
Face-centered composite rotational design and response variables for fermented lentil obtained in experimental conditions.

Time (h)	pH	Protein (mg/g)	Peptides (mg/g)	Phenolic compounds (mg GAE/g)	ORAC (mM TE/g)	ACE inhibition (%) <sup>1</sup>	$\alpha$ -Glucosidase inhibition (%) <sup>1</sup>	Lipase inhibition (%) <sup>2</sup>	Inhibition of NO production (%) <sup>2</sup>
5.5 (-1)	6.8 (-1)	721.15 ± 20.35 <sup>g</sup>	223.10 ± 21.68 <sup>c</sup>	59.84 ± 0.92 <sup>f</sup>	391.93 ± 23.55 <sup>de</sup>	77.74 ± 0.58 <sup>f</sup>	nd	40.44 ± 1.88 <sup>ab</sup>	33.90 ± 5.05 <sup>abc</sup>
5.5 (-1)	8.2 (+1)	813.92 ± 83.05 <sup>h</sup>	288.70 ± 20.30 <sup>e</sup>	72.10 ± 1.12 <sup>g</sup>	437.08 ± 26.38 <sup>ef</sup>	83.04 ± 0.72 <sup>g</sup>	nd	43.75 ± 1.01 <sup>ab</sup>	39.74 ± 5.33 <sup>bed</sup>
25.5 (+1)	6.8 (-1)	245.78 ± 19.43 <sup>a</sup>	215.50 ± 17.16 <sup>c</sup>	50.95 ± 1.04 <sup>e</sup>	431.42 ± 33.31 <sup>def</sup>	48.24 ± 4.48 <sup>b</sup>	40.55 ± 2.50 <sup>a</sup>	57.43 ± 1.66 <sup>c</sup>	41.39 ± 2.20 <sup>d</sup>
25.5 (+1)	8.2 (+1)	461.68 ± 23.72 <sup>e</sup>	260.92 ± 19.33 <sup>d</sup>	63.01 ± 3.67 <sup>f</sup>	381.56 ± 20.36 <sup>g</sup>	58.53 ± 3.99 <sup>c</sup>	nd	39.16 ± 0.88 <sup>a</sup>	34.85 ± 1.09 <sup>abc</sup>
15 (0)	6.5 (- $\alpha$ )	334.25 ± 9.82 <sup>b</sup>	215.82 ± 19.14 <sup>c</sup>	40.12 ± 0.35 <sup>b</sup>	473.44 ± 40.88 <sup>g</sup>	94.25 ± 1.62 <sup>h</sup>	nd	46.32 ± 2.54 <sup>ab</sup>	50.25 ± 2.88 <sup>e</sup>
15 (0)	8.5 (+ $\alpha$ )	625.30 ± 22.49 <sup>f</sup>	378.47 ± 15.04 <sup>f</sup>	74.69 ± 0.83 <sup>g</sup>	582.21 ± 18.32 <sup>h</sup>	95.18 ± 1.70 <sup>g</sup>	53.24 ± 8.72 <sup>b</sup>	37.50 ± 1.29 <sup>a</sup>	39.69 ± 4.58 <sup>bed</sup>
30 (+ $\alpha$ )	7.5 (0)	280.16 ± 15.64 <sup>a</sup>	162.50 ± 14.86 <sup>b</sup>	43.40 ± 3.80 <sup>c</sup>	338.83 ± 6.47 <sup>b</sup>	46.60 ± 3.89 <sup>d</sup>	89.43 ± 6.41 <sup>c</sup>	48.89 ± 8.47 <sup>b</sup>	33.56 ± 1.92 <sup>ab</sup>
15 (0)	7.5 (0)	387.48 ± 23.37 <sup>cd</sup>	226.53 ± 28.93 <sup>c</sup>	45.28 ± 2.91 <sup>cd</sup>	338.49 ± 13.91 <sup>b</sup>	71.44 ± 2.23 <sup>e</sup>	34.46 ± 2.56 <sup>a</sup>	38.63 ± 0.58 <sup>a</sup>	34.53 ± 2.52 <sup>abc</sup>
15 (0)	7.5 (0)	420.02 ± 17.51 <sup>d</sup>	236.43 ± 27.03 <sup>cd</sup>	45.74 ± 1.25 <sup>cd</sup>	340.23 ± 14.14 <sup>bc</sup>	72.93 ± 2.53 <sup>e</sup>	38.97 ± 1.41 <sup>a</sup>	37.15 ± 0.59 <sup>a</sup>	38.93 ± 5.00 <sup>cd</sup>
15 (0)	7.5 (0)	348.58 ± 13.64 <sup>bc</sup>	232.59 ± 11.56 <sup>c</sup>	47.63 ± 0.42 <sup>d</sup>	351.41 ± 20.19 <sup>cd</sup>	71.89 ± 2.25 <sup>e</sup>	35.71 ± 2.63 <sup>a</sup>	35.78 ± 2.78 <sup>a</sup>	35.18 ± 5.07 <sup>a</sup>

Data are the mean ± standard deviation of three replicates. Different lowercase letters within a row indicate statistical differences among treatments ( $p < .05$ , Duncan test).

nd: not detected; ORAC: oxygen radical absorbance capacity; ACE: angiotensin I converting enzyme; NO: nitric oxide.

<sup>1</sup> Final concentration assayed was 0.5 mg fermented lentil/mL.

<sup>2</sup> Final concentration assayed was 2 mg fermented lentil/mL.

significance level at  $p < .05$  obtained from the analysis of variance (ANOVA).

A simultaneous optimization of all responses was performed to achieve a minimum content of protein and maximum content of peptides, soluble phenolics and biological activities of fermented lentil. The simultaneous optimization was performed by the desirability approach. For these purpose, the models for all responses were combined and condensed to overall Desirability Function using Statistica v.7.0. For verification of the calculated optimal fermentation conditions predicted values were compared with experimental values.

Experimental data shown in Tables 1 and 3 represent the mean and standard deviation of three independent experiments. Values in Tables 1 and 3 were subjected to one-way ANOVA to compare mean values between fermented and non-fermented lentil using Statgraphics 5.0 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA). Comparison between groups was performed using Duncan's multiple-range test, and differences were considered significant at  $p \leq .05$ .

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Response surface models data fitting and statistical analysis

In order to know whether fermentation pH and time were factors significantly affecting protein, peptides, phenolic compounds and biological activities (antioxidant, ACE-,  $\alpha$ -glucosidase-, pancreatic lipase-inhibitory and anti-inflammatory activities) of lentil soluble fraction, the experimental design shown in Table 1 was performed.

Table 1 shows a wide variability among the average response values as function of the parameter settings of the experiments (245.8–813.9 mg protein/g, 162.5–378.5 mg peptide/g, 40.1–74.7 mg GAE/g, 338.5–582.2 mM TE/g, 46.6–95.2% inhibition of ACE, non detected–89.4% inhibition of intestinal  $\alpha$ -glucosidase, 35.8–57.4% inhibition of pancreatic lipase and 33.6–50.3% inhibition of NO production in LPS-induced macrophages). These results indicated that fermentation conditions have a noticeable impact on the composition and biological activities of the soluble fraction of fermented lentil.

To study the effect of fermentation parameters on the soluble fraction composition and biological activities of fermented lentil, experimental data of each dependent variable (Table 1) were submitted to ANOVA and regression analysis. The estimated linear, quadratic and interaction coefficients of equations are shown in Table 2. Experimental values for intestinal  $\alpha$ -glucosidase inhibition were insufficient to get a regression model, therefore this response variable is not shown in Table 2. Linear, quadratic and interaction coefficients with significant probability value ( $p \leq .05$ ) were included in the regression equations. According to ANOVA results (Table 2), the empirical polynomial regression models [Eqs. (2)–(8)] for all response variables used to fit the data are shown below:

$$\text{Protein (mg/g)} = 6537.76 - 1538.18X_1 + 106.62X_1^2 - 92.40X_2 + 1.19X_2^2 + 4.49X_1X_2 \quad (2)$$

$$\text{Peptides (mg/g)} = 3659.45 + 990.35X_1 + 70.51X_1^2 + 9.29X_2 - 0.22X_2^2 \quad (3)$$

$$\text{Phenolic compounds (mg GAE/g)} = 648.08 + 167.71X_1 + 12.06X_1^2 - 2.80X_2 + 0.05X_2^2 \quad (4)$$

$$\text{ORAC (mM TE/g)} = 9975.33 + 2613.08X_1 + 176.64X_1^2 - 0.13X_2^2 \quad (5)$$

$$\text{ACE inhibition (\%)} = 1159.02 - 291.61X_1 + 19.42X_1^2 - 0.10X_2^2 \quad (6)$$

$$\text{Lipase inhibition (\%)} = 404.22 - 103.61X_1 + 7.41X_1^2 - 4.78X_2 - 0.05X_2^2 - 0.82X_1X_2 \quad (7)$$

$$\text{NO inhibition (\%)} = 368.60 - 92.64X_1 + 6.49X_1^2 + 3.42X_2 - 0.49X_1X_2 \quad (8)$$

where  $X_1$  and  $X_2$  were pH and time (h), respectively. The negative and

**Table 2**  
Regression coefficients and analysis of the variance (ANOVA) for response surface quadratic models.

Parameter	Proteins		Peptides		Phenolic compounds		Antioxidant activity		ACE inhibition		Lipase inhibition		NO inhibition	
	Coefficients	p	Coefficients	p	Coefficients	p	Coefficients	p	Coefficients	p	Coefficients	p	Coefficients	p
Intercept	<b>6537.76</b>	0.0000	<b>3659.45</b>	0.0000	<b>648.08</b>	0.0000	<b>9975.33</b>	0.0000	<b>1159.02</b>	0.0000	<b>404.22</b>	0.0006	<b>368.60</b>	0.0008
(1) pH (L)	<b>-1538.18</b>	0.0000	<b>990.35</b>	0.0000	<b>167.71</b>	0.0000	<b>2613.08</b>	0.0000	<b>-291.61</b>	0.0000	<b>-103.61</b>	0.0009	<b>-92.64</b>	0.0013
(1) pH (Q)	<b>106.62</b>	0.0000	<b>70.51</b>	0.0000	<b>12.06</b>	0.0000	<b>176.64</b>	0.0000	<b>19.42</b>	0.0000	<b>7.41</b>	0.0004	<b>6.49</b>	0.0008
(2) Time (L)	<b>-92.40</b>	0.0000	<b>9.29</b>	0.0402	<b>-2.80</b>	0.0050	<b>1.24</b>	0.7671	<b>0.47</b>	0.7488	<b>4.78</b>	0.0002	<b>3.42</b>	0.0095
(2) Time (Q)	<b>1.19</b>	0.0000	<b>-0.22</b>	0.0000	<b>0.05</b>	0.0000	<b>-0.13</b>	0.0066	<b>-0.10</b>	0.0000	<b>0.05</b>	0.0000	<b>0.00</b>	0.5680
IL by 2L	<b>4.49</b>	0.0001	<b>-0.50</b>	0.3876	<b>0.08</b>	0.4895	<b>0.37</b>	0.49389	<b>0.21</b>	0.2415	<b>-0.82</b>	0.0000	<b>-0.49</b>	0.0046
<i>Model summary statistics</i>														
F-Value		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.014
R <sup>2</sup>		332.61		223.18		1626.76		108.68		332.71		46.10		6.68
R <sup>2</sup> adjusted		0.9569		0.8533		0.9192		0.8935		0.8842		0.7896		0.3683
		0.9527		0.8383		0.9142		0.8862		0.8708		0.7595		0.2829

Regression coefficients in bold are statistically significant ( $p < .05$ ).

Abbreviations: L: Linear coefficient; Q: quadratic coefficient; IL by 2L: interaction coefficient; ACE: angiotensin I converting enzyme; NO: nitric oxide. Coefficient values formatted in bold are statistically significant (ANOVA,  $p < .05$ ).

positive coefficients for the model components indicate the favorable and unfavorable effects on each dependent variable, respectively.

To avoid poor response surface results, the adequacy and fitness of the models were checked using regression analysis and ANOVA. In general, ANOVA results confirmed that the equations can efficiently depict the relationship between independent and dependent variables (Table 2). The F-value, ratio of the regression mean square and real error mean, indicate the effect of the individual controlled factor on the model. F-values with a very low probability value ( $p < .0001$ ) show that the deviation in the responses could be explained by the regression equation, indicating that all models were significant ( $p \leq .05$ ), with the exception of the model for antiinflammatory activity ( $p = .014$ ).

The adequacy and suitability of the models were checked by the coefficient of determination values. Acceptable R<sup>2</sup> were obtained for most of the models including protein (0.96), peptide (0.85), phenolic compounds (0.91), antioxidant activity (0.89), ACE inhibition (0.88), and lipase inhibition (0.79) (Table 2). These values indicated that at least 80% of experimental data suit the model. The R<sup>2</sup> adjusted-values for protein (0.95), peptides (0.83), phenolic compounds (0.91), ORAC (0.89), ACE inhibition (0.87) and lipase inhibition (0.76) denoted high correlation of the observed and predicted values. The quadratic model for NO inhibition (R<sup>2</sup> and R<sup>2</sup> adjusted values of 0.37 and 0.26, respectively) was poor, therefore, this model was not used to interpret the impact of pH and time on the anti-inflammatory activity of fermented lentil soluble fraction nor in computing predicted values at optimal fermentation conditions.

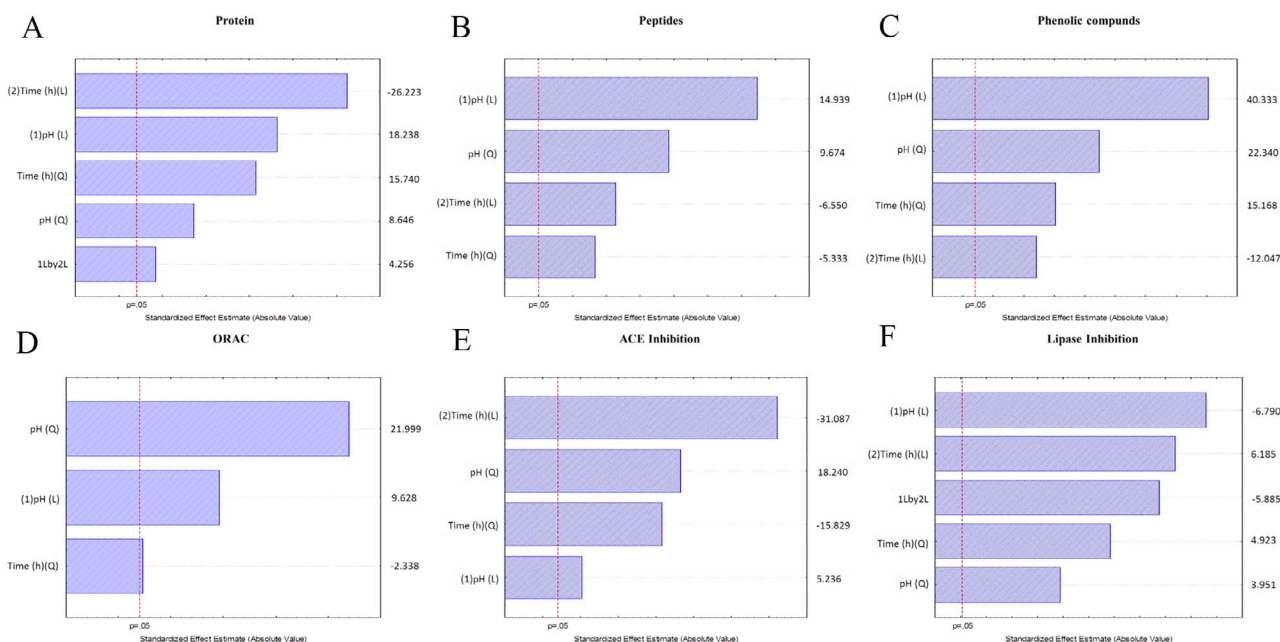
### 3.2. Effect of fermentation time and pH on soluble protein, peptides and phenolic compounds

The significant effects of fermentation pH and time (linear and quadratic) and their interactions on response variables can be observed from the Pareto charts (Fig. 1A–F). Three dimensional surface graphs of the significant mutual interaction of pH and time and their optimum levels are shown in Fig. 2A–F.

Soluble protein content was mainly affected by linear effects of time and pH although quadratic and interaction effects were also significant ( $p < .0001$ , Fig. 1A). The protein content was reduced by increasing time (Fig. 2A), which is attributed to proteolysis and generation of peptides and free amino acids by the action of Savinase (García-Mora et al., 2014) and *L. plantarum* proteolytic system (De Angelis, Calasso, Cavallo, Di Cagno, & Gobbetti, 2016). Conversely, soluble protein content increased with higher pH values (Fig. 2A) due to the increased solubility of lentil proteins at pH 8–12 (Limón, Peñas, Martínez-Villaluenga, & Frias, 2014).

Fermentation pH was the most dominant factor affecting the peptide content of fermented lentil (Fig. 1B). Linear and quadratic effects of pH had a significantly positive influence on peptide content while the quadratic effect of time has a negative impact ( $p < .0001$ , Fig. 1B). Peptide content increased significantly at higher pH values. This result suggests a higher proteolytic efficiency at alkaline pH which is consistent with the optimum protease activity of Savinase at pH 8 (García-Mora, Peñas, Frias, Gomez, & Martínez-Villaluenga, 2015; García-Mora et al., 2014). Peptide content increased along with fermentation time reaching a maximum at 20 h, after which peptide content decreased (Fig. 2B).

Proteolytic efficiency at experimental fermentation conditions was further confirmed by SDS-PAGE. Fig. 3 shows the protein profiles of untreated lentil flour and fermented lentil by *L. plantarum* and Savinase at different pH and time. Untreated lentil flour (Fig. 3, lane 1) showed a similar protein profile to that previously reported (García-Mora et al., 2014) composed of nine predominant polypeptides (bands A–J) with estimated molecular weights (MW) ranging from 14 to 90 kDa likely corresponding to lipoxygenase isoforms (bands A and B, lane 1) and subunits of 7S (bands C, D, E and F) and 11S globulins (bands G, H, I and J). In general, pH-controlled fermentation using *L. plantarum* and

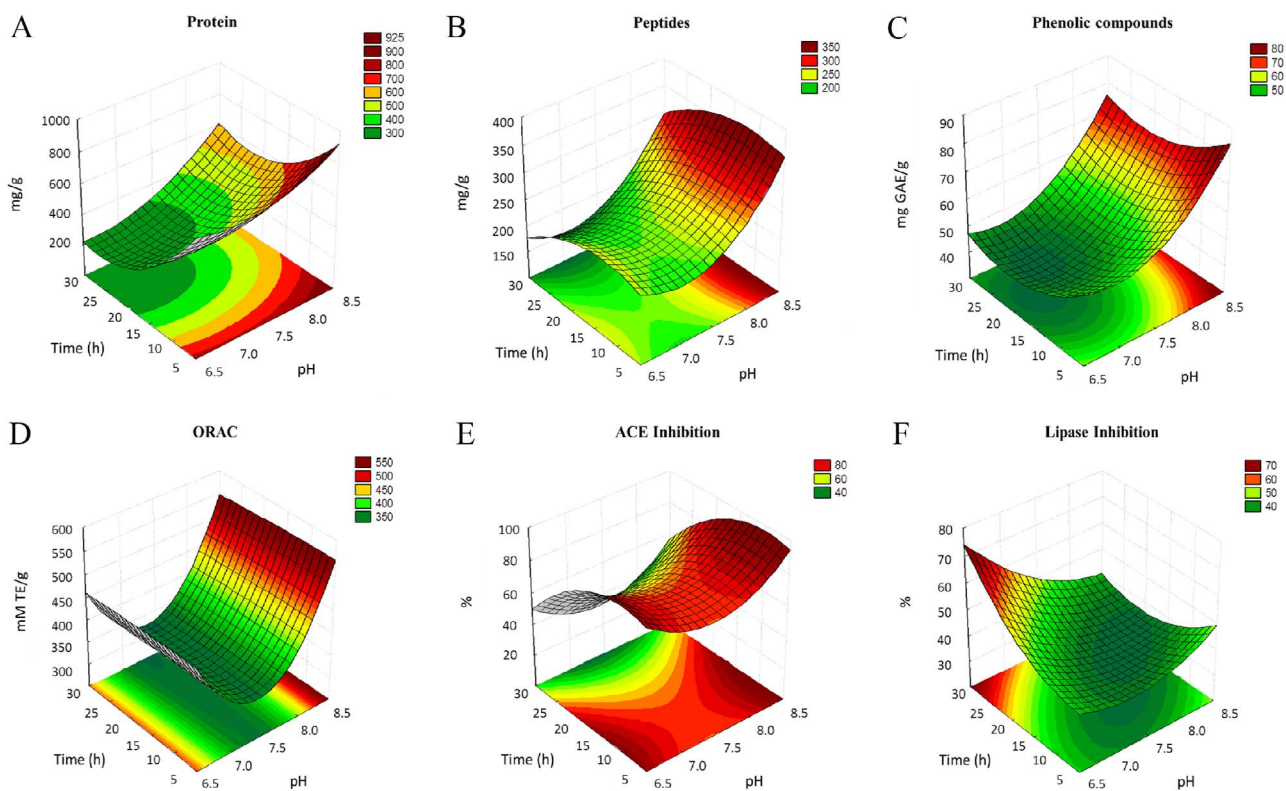


**Fig. 1.** Pareto charts of standardized effect estimates (absolute value) for (A) protein content (mg/g soluble fraction), (B) peptide content (mg/g soluble fraction), (C) phenolic compounds (mg GAE/g soluble fraction), (D) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) (mM TE/g soluble fraction), (E) Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity (% inhibition), (F) pancreatic lipase inhibitory activity (% inhibition). L: linear effect; Q: quadratic effect; 1L by 2L: interaction effect.

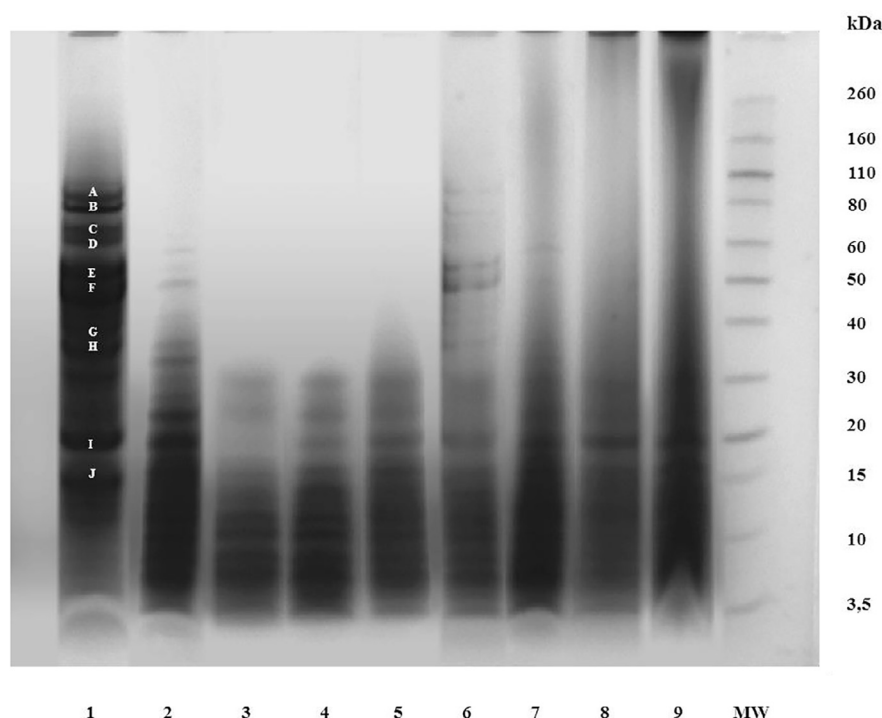
Savinase (lanes 2–9) led to an extensive proteolysis and protein degradation, which was reflected in the disappearance or loss of intensity of the main protein bands, along with the appearance of low MW protein fragments (3.5–15 kDa). Protein degradation increased as function of time regardless the pH in which fermentation was performed. Moreover, pH affected proteolytic efficiency of enzymes during

fermentation. Lentil fermentation at pH above 8 (lanes 7, 8 and 9) showed a faster protein degradation and generation of low MW protein fragments compared to fermentation at pH 6 (lanes 2, 3 and 4) and pH 7 (lanes 5 and 6). These results confirmed a higher proteolytic efficiency during lentil fermentation at pH 8–8.5.

Total phenolic content in the soluble fraction was positively affected



**Fig. 2.** Response surface 3D contour plots for combined effect of fermentation pH and time on (A) protein content, (B) peptides content, (C) phenolic compounds content, (D) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC), (E) Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity, (F) lipase inhibitory activity of the soluble fraction of fermented lentil.



**Fig. 3.** Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under denaturing conditions of untreated lentil flour (lane 1) and fermented lentil by *L. plantarum* and Savinase at pH 6.8 for 5.5 h (lane 2); pH 6.5 for 15 h (lane 3) pH 6.8 for 25.5 h (lane 4); pH 7.5 for 30 h (lane 5); pH 7.5 for 15 h (lane 6); pH 8.2 for 5.5 h (lane 7); pH 8.5 for 15 h (lane 8); pH 8.2 for 25.5 h (lane 9). MW: prestained molecular weight marker.

by linear and quadratic effects of pH ( $p < .05$ , Fig. 1C). Similar to peptide content, soluble fraction had a higher concentration of phenolic compounds when fermentation was carried out at higher pH (Fig. 2C). The increase of phenolic compounds in the soluble fraction of fermented lentil could be related to the enzymatic and non-enzymatic release of bound phenolic compounds (Chandrasekara & Shahidi, 2010). Limon et al. (2015) observed that phenolic compound solubility is pH-dependent, being higher at pH 8–12. Alkaline conditions favor the hydrolysis of linkages between phenolic compounds and polysaccharides of the cell wall (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe, & Serna-Saldívar, 2014). On the other hand, *L. plantarum* produces carbohydrases,  $\beta$ -glucosidases and a broad range of esterases which are highly specific and effective in releasing bound phenolic compounds that are cross-linked with cellulose and hemicelluloses in plant cell wall matrix, linked to glucosides or esterified to arabinoxylans and pectin, respectively (Esteban-Torres et al., 2016). Activity of these enzymes is similar at neutral and mild alkaline conditions (Esteban-Torres et al., 2015; Sestelo, Poza, & Villa, 2004). In addition, Savinase was characterized to have esterase activity at pH 8 (García-Mora et al., 2015), therefore, Savinase could contribute to the increased soluble phenolic content of fermented lentil in mild alkaline conditions.

### 3.3. Effect of fermentation time and pH on biological activity of lentil

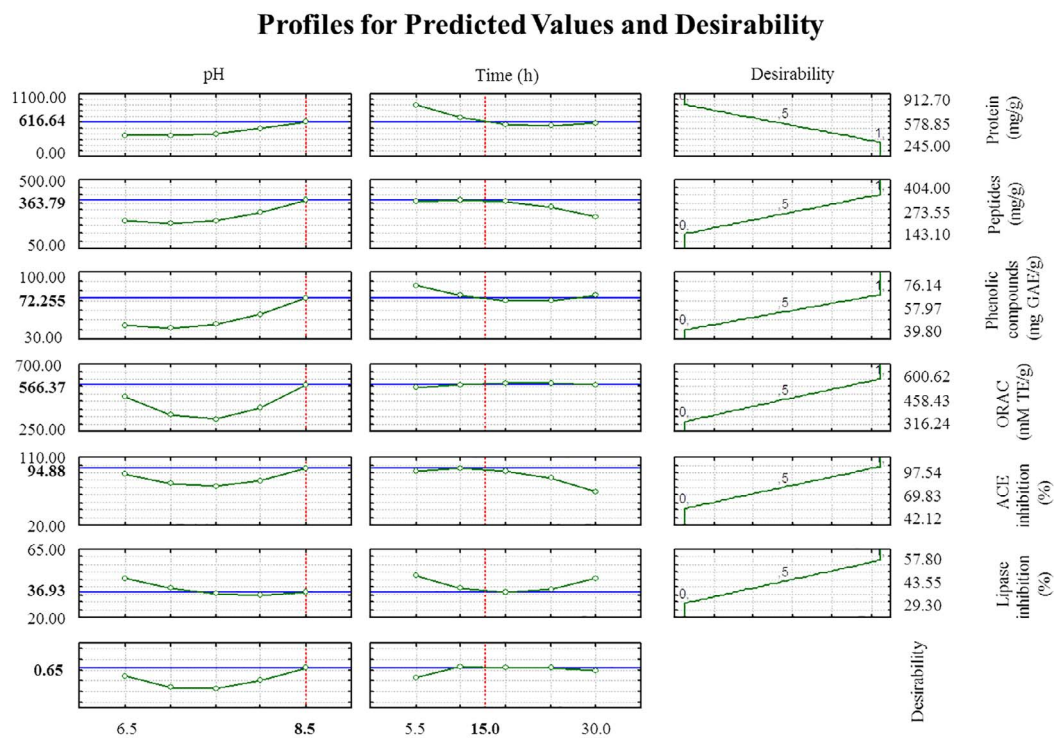
Oxidative stress generated by an overproduction of reactive oxygen species (ROS) has been linked to the promotion of inflammation processes and MetS (Greene et al., 2011). Fermentation pH was the main factor affecting the antioxidant activity of lentil soluble fraction. Fig. 1D shows that pH had positive linear and quadratic effects on antioxidant activity ( $p < .0001$ ) while quadratic effect of time showed a negative influence ( $p < .05$ ). Antioxidant activity decayed up to pH 7.5 from which it increased gradually to reach a maximum value at pH 8.5 (Fig. 2D). As shown in Fig. 2D, time had no linear effect on antioxidant activity in contrast with previous findings showing that antioxidant activity of casein hydrolysates is higher at longer hydrolysis time (Nongonierma, Maux, Esteveny, & FitzGerald, 2017). The increased antioxidant activity of fermented lentil at alkaline conditions might be attributed to the higher content of soluble phenolics and peptides in the

soluble fraction. Lentil proteolysis using Savinase at pH 8.5 produces peptides with the ability to scavenge peroxy radicals (García-Mora et al., 2017). In addition, alkaline pH favors the non-enzymatic release of bound phenolic compounds, a fact that is related to higher soluble phenolic content and antioxidant activity in fermented lentil. Both peptides and phenolic compounds have shown to elicit synergistic antioxidant activity as recently reported by Cao and Xiong (2017) for whey protein hydrolysate, gallic acid and epigallocatechin gallate mixtures. On the other hand, pH could influence the antioxidant activity during lentil fermentation by changing the structure of the phenolic compounds. Catechins, one of the predominant phenolic compounds in lentils, enhance its electron-donating ability upon deprotonation with increasing pH values (Muzolf, Szymusiak, Gliszczynska-Swiglo, Rietjens, & Tyrakowska, 2008).

ACE indirectly increases blood pressure by causing blood vessels to constrict. The inhibition of ACE is considered to be one of the most effective strategies for managing hypertension and attenuate the progression of MetS. Peptides and phenolic compounds are considered to be the main compounds in lentil displaying ACE-inhibitory activity (García-Mora et al., 2017; Mamilla & Mishra, 2017). Fermentation time had a negative quadratic influence on ACE-inhibitory activity of soluble fraction ( $p < .0001$ , Fig. 1E). ACE-inhibitory activity increased up to 16 h, time after which begins to decay (Fig. 2E). This trend is consistent with a previous study in which longer hydrolysis times caused the degradation of ACE-inhibitory peptides in lentil hydrolysates (García-Mora et al., 2014). In contrast, pH had a significantly positive impact on the antihypertensive potential of fermented lentil which reached a maximum value when fermentation was performed at pH 8.5 (Fig. 2E). This effect could be explained by the higher hydrolytic efficiency on proteins and bound phenolics that take place at alkaline pH.

The inhibition of  $\alpha$ -glucosidase reduces intestinal digestion of disaccharides and further absorption of glucose, consequently controlling the postprandial glycemic response (Tan, Chang, & Zhang, 2017). Differences in terms of the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of fermented lentil were observed (Table 1). The  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of 0.5 mg/mL of fermented lentil ranged from 0 to 89% for sucrose hydrolysis. Experimental data did not fit the regression model; therefore, differences on  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity could not be explained

A



B

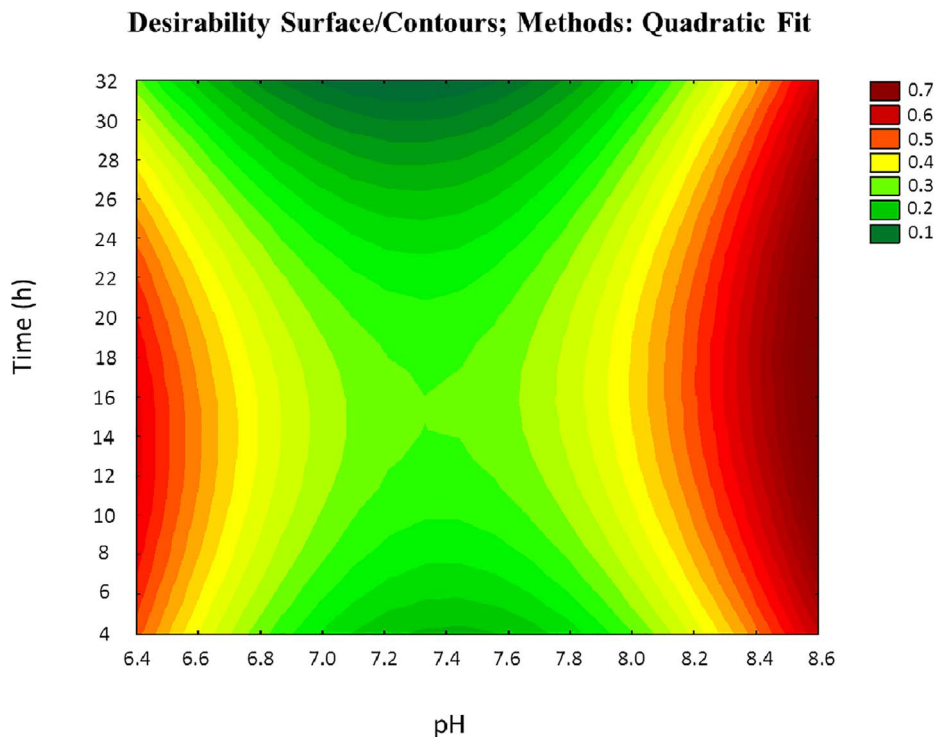


Fig. 4. (A) Desirability function profile for protein, peptide and phenolic content, Oxygen radical absorbance capacity (ORAC), Angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory, and lipase inhibitory activities of soluble fraction of fermented lentil. (B) Bidimensional contour plot for desirability as function of fermentation pH and time.

as function of fermentation pH and time. Additional parameters (e.g. temperature, enzyme/flour ratio, inoculum size) may be studied in order to further identify those that have a significant impact in  $\alpha$ -glucosidase activity. Zhang et al. (2015) evaluated the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of phenolic extracts from 20 Canadian lentil cultivars. Results from this study demonstrated that only flavonols were able to inhibit intestinal  $\alpha$ -glucosidase. On the basis of the study of Zhang et al. (2015), differences on the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity observed in our study among fermentation conditions could be due to variations on the flavonol content.

Pancreatic lipase, a key enzyme responsible for triglyceride absorption in the small intestine, is secreted from the pancreas and hydrolyses triglyceride into glycerol and fatty acids (Buchholz & Melzig, 2015). Suppression and delay of triglyceride digestion and absorption through inhibition of lipase are a key approach to the control of hyperlipidaemia and obesity, both components of the MetS. Lipase-inhibitory activity of lentil varied depending on fermentation conditions. The linear, quadratic and interaction effects of fermentation pH and time were significant ( $p < .05$ , Fig. 1F). The parameter showing the highest impact was pH, which negatively influenced the lipase-inhibitory activity of fermented lentil (Fig. 1F). Similarly, interaction of both fermentation parameters had a negative impact on pancreatic lipase inhibition. In contrast, linear and quadratic terms of time and quadratic term of pH showed a positive effect. The inhibitory effects on pancreatic lipase activity of polyphenol-rich extracts have been reported in previous studies (Buchholz & Melzig, 2015). Lipase inhibitory activity of lentil has been associated to flavonols such as kaempferol and quercetin aglycones and glycosides (Zhang et al., 2015). Considering that flavonols become unstable under neutral and alkaline conditions (Li et al., 2016), it was consistent to reach the maximum lipase inhibitory activity (80%) at longer fermentation times (above 30 h) and lower pH values (6.4) (Fig. 2F).

MetS is characterized by a chronic inflammation grade below the threshold of pain, which raises the concentration of inflammatory markers in the systemic circulation (Martínez-Larrad et al., 2016). Because NO is an important mediator involved in multiple inflammatory pathways, inhibition of its production by bioactive components is a clear indication of antiinflammatory activity (Sharma, Al-Omran, & Parvathy, 2007). Cell treatments with soluble fraction of fermented lentil (0.5 mg/mL) did not affect RAW264.7 cells viability (data not shown) and reduced significantly the secretion of NO by LPS-stimulated RAW267.4 macrophages (33.5–50.2% inhibition) compared to control cells (Table 1). Statistical differences in the antiinflammatory potential of fermented lentil produced at different pH and time were observed. It is relevant to notice that maximum antiinflammatory activity in fermented lentil was reached at pH 6.5 for 15 h. Considering that the regression model for anti-inflammatory activity [Eq. (8)] was not statistically significant (Table 2) relationships between fermentation parameters (pH and time) and antiinflammatory activity of fermented lentil could not be established. Based on these results, additional processing parameters should be further studied. There is evidence showing that flavonols (kaempferol, quercetin and their derivatives) are the most potent antiinflammatory compounds in lentil soluble extracts. These flavonoids inhibit the mRNA expression of proinflammatory cytokines including TNF- $\alpha$ , IL6 and IL1 $\beta$  *in vivo* (Zhang et al., 2017) and hinder NO production induced by LPS in RAW264.7 cells, thereby lowering inflammatory response (Devi et al., 2015). Based on the literature, the highest antiinflammatory activity found in fermented lentil at pH 6.5 and 15 h (50% inhibition) could be related to the higher stability of flavonols at those fermentation conditions (Li et al., 2016). Previous studies have attributed the antiinflammatory activity of protein hydrolysates to specific bioactive peptides (López-Barríos, Antunes-Ricardo, & Gutiérrez-Urbe, 2016); however, anti-inflammatory peptides derived from lentil proteins have not been identified so far.

### 3.4. Multivariate optimization of fermentation parameters and validation of predictive models

Response and desirability profiling were performed to determine the levels of the independent variables that produce the most desirable predicted values for peptide, phenolic compounds and biological activities of the soluble fraction of fermented lentil by using desirability function (Fig. 4A). The optimal condition of lentil fermentation was ascertained to obtain the lowest soluble protein content and the highest peptides and phenolic contents, antioxidant, ACE and pancreatic lipase inhibitory activities. Based on this criterion, lentil fermentation at pH 8.5 for 11.63 h with an overall desirability of 0.66 was predicted to produce 693.1 mg protein, 368.3 mg peptides, 75.7 mg GAE and 561.1 mM TE per gramme of soluble fraction. Moreover, soluble fraction of fermented lentil produced in the optimal conditions inhibited ACE by 95.85% at 0.5 mg/mL ( $IC_{50}$  = 0.14 mg/mL) and pancreatic lipase by 39.34% inhibition at 2.0 mg/mL. The overall performance of fermented lentil produced in optimal conditions using *L. plantarum* and Savinase was improved compared to our previous studies focused on uncontrolled pH fermentation of lentil using *L. plantarum* (30 mg GAE/g, 300 mM TE/g and  $IC_{50}$  for ACE inhibition of 0.20 mg/mL) and lentil protein hydrolysis using Savinase (34 mg peptides/g, 224 mM TE/g and  $IC_{50}$  value for ACE inhibition of 0.20 mg/mL) (García-Mora et al., 2014; Torino et al., 2013).

The suitability of the established regression models for prediction of response values was tested selecting a fermentation experiment within the range of maximum desirability. Fermentation conditions with the highest desirability value were pH 8.5–8.6 and 10–26 h (Fig. 4B). Based on this observation, Table 3 shows predicted and experimental values at pH 8.5 and 15 h and their comparison to non-fermented lentil soluble fraction at pH 8.5. Experimental values were similar to predicted values, which indicated that empirical models are suitable for the chemical and biological characterization of fermented lentil and optimization of pH-controlled fermentation using *L. plantarum* and Savinase. As compared to water soluble extract obtained from non-fermented lentil at pH 8.5, lentil fermentation at pH 8.5 for 15 h provided 6.0, 1.3, 1.9, 4.8, 53.2, and 2.5-fold higher levels of peptides, soluble phenolic compounds, antioxidant, ACE-inhibitory and  $\alpha$ -glucosidase-inhibitory and anti-inflammatory activities (Table 3). Moreover, 74% of initial lipase inhibitory activity of lentil soluble fraction was retained after fermentation in mild alkaline conditions for 15 h.

## 4. Conclusions

This is the first study that has employed a RSM approach during

**Table 3**  
Predicted and experimental response values at optimal fermentation conditions in comparison to non-fermented lentil soluble fraction at pH 8.5.

Response variables	Predicted values	Experimental values	Control
Protein (mg/g)	616.64	625.30 $\pm$ 22.49 <sup>a</sup>	824.70 $\pm$ 50.63 <sup>b</sup>
Peptides (mg/g)	363.79	378.47 $\pm$ 15.04 <sup>b</sup>	63.10 $\pm$ 2.81 <sup>a</sup>
Phenolic compounds (mg GAE/g)	72.25	74.69 $\pm$ 0.83 <sup>b</sup>	56.40 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>
ORAC (mM TE/g)	566.37	582.21 $\pm$ 18.32 <sup>b</sup>	302.70 $\pm$ 25.58 <sup>a</sup>
ACE inhibition (%)	94.89	95.18 $\pm$ 18.32 <sup>b</sup>	19.65 $\pm$ 2.88 <sup>a</sup>
$\alpha$ -Glucosidase inhibition (%)	–	53.24 $\pm$ 8.72 <sup>a</sup>	81.11 $\pm$ 5.015 <sup>b</sup>
Lipase inhibition (%)	36.93	37.50 $\pm$ 1.29 <sup>a</sup>	50.58 $\pm$ 7.09 <sup>b</sup>
Inhibition of NO production (%)	–	35.18 $\pm$ 5.07 <sup>b</sup>	13.94 $\pm$ 2.42 <sup>a</sup>

Data are the mean  $\pm$  standard deviation of three replicates. Different lowercase letters indicate statistical differences between control and fermented lentil soluble fractions at optimal conditions ( $p < .05$ , Duncan test). ORAC: oxygen radical absorbance capacity; ACE: angiotensin I converting enzyme; NO: nitric oxide.

fermentation and enzymatic hydrolysis of lentil proteins with the objective to optimize the generation of peptides and soluble phenolics displaying an array of relevant bioactivities to attenuate the cardio-metabolic risk factors of MetS. The two main fermentation parameters (pH and time) had an effect on proteins, peptides and phenolic contents as well as on potential antioxidant, antihypertensive, hypoglycemic, hypolipidemic and antiinflammatory activities of fermented lentil. Fermentation pH is the main factor affecting positively to peptides, soluble phenolic compounds and antioxidant activity whereas it has a negative impact on lipase inhibitory activity. Fermentation time has a dominant positive effect on protein hydrolysis whereas affects negatively ACE inhibitory activity of fermented lentil. In contrast, fermentation parameters having an impact on  $\alpha$ -glucosidase inhibitory and antiinflammatory activities were not identified. Optimal fermentation conditions were pH 8.5 and 11.6 h yielding a combination of desirable levels of peptides, soluble phenolic and bioactivities. These findings encourage the implementation of pH-controlled fermentation using *L. plantarum* and Savinase for the production of bioactive compounds and enhancement of lentil functional properties and may serve as a starting point for innovation in the agri-food industry.

### Funding sources

This work was supported by the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, Spain) and FEDER programme (Grant No. AGL2013-43247-R). E. Peñas is indebted to Ramón y Cajal Programme financed by the Spanish MINECO.

### Conflict of interest

None.

### References

- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, *152*, 46–55.
- Buchholz, T., & Melzig, M. F. (2015). Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors. *Planta Medica*, *81*, 771–783.
- Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., & Oomah, B. D. (2010). Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Research International*, *43*, 461–482.
- Cao, Y., & Xiong, Y. L. (2017). Interaction of whey proteins with phenolic derivatives under neutral and acidic pH conditions. *Journal of Food Science*, *82*, 409–419.
- Chandrasekara, A., & Shahidi, F. (2010). Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 6706–6714.
- De Angelis, M., Calasso, M., Cavallo, N., Di Cagno, R., & Gobbetti, M. (2016). Functional proteomics within the genus *Lactobacillus*. *Proteomics*, *16*, 946–962.
- Devi, K. P., Malar, D. S., Nabavi, S. F., Sureda, A., Xiao, J., Nabavi, S. M., & Daglia, M. (2015). Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacological Research*, *99*, 1–10.
- Esteban-Torres, M., Reverón, I., Santamaría, L., Mancheño, J. M., De las Rivas, B., & Muñoz, R. (2016). The Lp.3561 and Lp.3562 enzymes support a functional divergence process in the lipase/esterase toolkit from *Lactobacillus plantarum*. *Frontiers in Microbiology*, *7*(JUL).
- Esteban-Torres, M., Landete, J. M., Reverón, I., Santamaría, L., de las Rivas, B., & Muñoz, R. (2015). A *Lactobacillus plantarum* esterase active on a broad range of phenolic esters. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*, 3235–3242.
- Gan, R.-Y., Shah, N. P., Wang, M.-F., Lui, W.-Y., & Corke, H. (2016). Fermentation alters antioxidant capacity and polyphenol distribution in selected edible legumes. *International Journal of Food Science and Technology*, *51*, 875–884.
- García-Mora, P., Frias, J., Peñas, E., Zielinski, H., Gimenez-Bastida, J. A., Wiczkowski, W., ... Martínez-Villaluenga, C. (2015). Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) proteins by subtilisins. *Journal of Functional Foods*, *18*, 319–332.
- García-Mora, P., Martín-Martínez, M., Angeles Bonache, M., González-Múniz, R., Peñas, E., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2017). Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. *Food Chemistry*, *221*, 464–472.
- García-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., Gomez, R., & Martínez-Villaluenga, C. (2015). High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. *Food Chemistry*, *171*, 224–232.
- García-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2014). Savinase, the most suitable enzyme for releasing peptides from lentil (*Lens culinaris* var. Castellana) protein concentrates with multifunctional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*, 4166–4174.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, *126*, 131–138.
- Greene, E. R., Huang, S., Serhan, C. N., & Panigrahy, D. (2011). Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, *96*(1–4), 27–36.
- Jakubczyk, A., Karaś, M., Baraniak, B., & Pietrzak, M. (2013). The impact of fermentation and *in vitro* digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from pea proteins. *Food Chemistry*, *141*(4), 3774–3780.
- Kapravelou, G., Martínez, R., Andrade, A. M., López Chaves, C., López-Jurado, M., Aranda, P., ... Porres, J. M. (2015). Improvement of the antioxidant and hypolipidemic effects of cowpea flours (*Vigna unguiculata*) by fermentation: Results of *in vitro* and *in vivo* experiments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*, 1207–1216.
- Kim, Y. S., Lee, Y. M., Kim, H., Kim, J., Jang, D. S., Kim, J. H., & Kim, J. S. (2010). Anti-obesity effect of *Morus bombycis* root extract: Anti-lipase activity and lipolytic effect. *Journal of Ethnopharmacology*, *130*, 621–624.
- Li, X., Chen, F., Li, S., Jia, J., Gu, H., & Yang, L. (2016). An efficient homogenate-microwave-assisted extraction of flavonols and anthocyanins from blackcurrant marc: Optimization using combination of Plackett-Burman design and Box-Behnken design. *Industrial Crops and Products*, *94*, 834–847.
- Limón, R. I., Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C., & Frias, J. (2014). Role of elicitation on the health-promoting properties of kidney bean sprouts. *LWT – Food Science and Technology*, *56*, 328–334.
- Limón, R. I., Peñas, E., Torino, M. I., Martínez-Villaluenga, C., Dueñas, M., & Frias, J. (2015). Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extracts. *Food Chemistry*, *172*, 343–352.
- Liu, M., Bayjanov, J. R., Renckens, B., Nauta, A., & Siezen, R. J. (2010). The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: A genomic comparison. *BMC Genomics*, *11*, 36.
- López-Barrios, L., Antunes-Ricardo, M., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2016). Changes in antioxidant and antiinflammatory activity of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates due to germination and enzymatic digestion. *Food Chemistry*, *203*, 417–424.
- Mamilla, R. K., & Mishra, V. K. (2017). Effect of germination on antioxidant and ACE inhibitory activities of legumes. *LWT – Food Science and Technology*, *75*, 51–58.
- Martínez, R., López-Jurado, M., Wanden-Berghe, C., Sanz-Valero, J., Porres, J. M., & Kapravelou, G. (2016). Beneficial effects of legumes on parameters of the metabolic syndrome: A systematic review of trials in animal models. *British Journal of Nutrition*, *116*, 1–23.
- Martínez-Larrad, M. T., Corbatón-Anchuelo, A., Fernández-Pérez, C., Lazcano-Redondo, Y., Escobar-Jiménez, F., & Serrano-Ríos, M. (2016). Metabolic syndrome, glucose tolerance categories and the cardiovascular risk in Spanish population. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *114*, 23–31.
- Miralí, M., Purves, R. W., & Vandenberg, A. (2016). Phenolic profiling of green lentil (*Lens culinaris* Medik.) seeds subjected to long-term storage. *European Food Research and Technology*, *242*(12), 2161–2170.
- Muzolf, M., Szymusiak, H., Gliszczynska-Swiglo, A., Rietjens, I. M. C. M., & Tyrakowska, B. (2008). pH-dependent radical scavenging capacity of green tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 816–823.
- Nongonierma, A. B., Maux, S. L., Esteveny, C., & FitzGerald, R. J. (2017). Response surface methodology applied to the generation of casein hydrolysates with antioxidant and dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*, 1093–1101.
- Pistollato, F., & Battino, M. (2014). Role of plant-based diets in the prevention and regression of metabolic syndrome and neurodegenerative diseases. *Trends in Food Science and Technology*, *97*, 1093–1101.
- Rui, X., Xing, G., Zhang, Q., Zare, F., Li, W., & Dong, M. (2016). Protein bioaccessibility of soymilk and soymilk curd prepared with two *Lactobacillus plantarum* strains as assessed by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *38*, 155–159.
- Sestelo, A. B. F., Poza, M., & Villa, T. G. (2004). B-Glucosidase activity in a *Lactobacillus plantarum* wine strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *20*, 633–637.
- Sharma, J. N., Al-Omran, A., & Parvathy, S. S. (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, *15*, 252–259.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, *299*, 152–178.
- Tan, Y., Chang, S. K. C., & Zhang, Y. (2017). Comparison of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera. *Food Chemistry*, *214*, 259–268.
- Torino, M. I., Limón, R. I., Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C., & Frias, J. (2013). Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry*, *136*(2), 1030–1037.
- Vilcacundo, R., Martínez-Villaluenga, C., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Release of dipeptidyl peptidase IV,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, *35*, 531–539.
- Zhang, B., Deng, Z., Ramdath, D. D., Tang, Y., Chen, P. X., Liu, R., ... Tsao, R. (2015). Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chemistry*, *172*, 862–872.
- Zhang, B., Deng, Z., Tang, Y., Chen, P. X., Liu, R., Dan Ramdath, D., ... Tsao, R. (2017). Bioaccessibility, *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolics in cooked green lentil (*Lens culinaris*). *Journal of Functional Foods*, *32*, 283–291.

---

#### 4.3. CAPÍTULO 3. Evaluación del escalado del proceso de fermentación en la composición y multifuncionalidad del ingrediente de lenteja desarrollado. Estudio de los mecanismos de acción antioxidante en un modelo celular de estrés oxidativo (publicación 4).

**Publicación 4.** La fermentación de lenteja a escala de planta piloto protege frente al estrés oxidativo desencadenado por *t*-BHP mediante la activación de Nrf2 dependiente de la fosforilación de SAPK/JNK.

Sara Bautista-Expósito, Elena Peñas, Juana Frias, Cristina Martínez-Villaluenga. Pilot-scale produced fermented lentil protects against *t*-BHP-triggered oxidative stress by activation of Nrf2 dependent on SAPK/JNK phosphorylation, *Food Chemistry*, 2019, 274:750-759.

#### RESUMEN

La fracción soluble de lenteja fermentada (LF) utilizando el proceso desarrollado en el marco de esta Tesis Doctoral demostró un efecto beneficioso en el metabolismo de lípidos, glucosa y el estrés oxidativo en ratas Zucker con SMet. Estos prometedores hallazgos impulsaron el estudio del efecto del escalado del proceso de fermentación e hidrólisis enzimática a nivel de planta piloto sobre el contenido de compuestos bioactivos y la actividad biológica de LF. Además, estudiamos los mecanismos moleculares por los cuales el digerido gastrointestinal de LF (DLF) ejercía un efecto citoprotector frente al estrés oxidativo inducido por *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BHP) en macrófagos murinos RAW 264.7. La producción a escala de planta piloto redujo los contenidos de proteínas, péptidos y compuestos fenólicos en LF y su eficacia biológica global, con la excepción de la actividad antioxidante. DLF inhibió la citotoxicidad inducida por *t*-BHP y la acumulación intracelular de ERO. Los mecanismos de acción antioxidante de DLF comprendían la activación de la expresión de la enzima catalasa mediante la fosforilación de proteínas quinasas activadas por estrés/Jun amino-terminal quinasas (SAPK/JNK) y la translocación nuclear de Nrf2. Con el objetivo de identificar los principales compuestos bioactivos responsables del efecto antioxidante observado se realizó una identificación y cuantificación de la fracción peptídica y fenólica de DLF. El contenido de péptidos y compuestos fenólicos totales de DLF fue de 180 mg/g y 1,20 mg/g, respectivamente, identificándose la presencia de varios oligopéptidos derivados de las proteínas convicilina, alergeno Len c 1.1001 y vicilina tipo B así como ácidos fenólicos y flavonoles. En conclusión, este estudio demostró por primera vez que DLF tiene un efecto citoprotector frente al estrés oxidativo, a través de la activación de las vías de señalización JNK/Nrf2 y la expresión de enzimas antioxidantes.





# Pilot-scale produced fermented lentil protects against *t*-BHP-triggered oxidative stress by activation of Nrf2 dependent on SAPK/JNK phosphorylation

Sara Bautista-Expósito, Elena Peñas, Juana Frias, Cristina Martínez-Villaluenga\*

Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain



## ARTICLE INFO

### Keywords:

Nfr2  
Lentil  
Digestion  
Peptides  
Phenolic compounds  
Oxidative stress

## ABSTRACT

Fermented lentil (FL) produced using *L. plantarum* and Savinase in alkaline conditions relieves metabolic alterations and oxidative stress in Zucker rats with metabolic syndrome. Here, we investigated the effect of up scaling the fermentation process on chemical composition and biological activity of FL. Moreover, we studied the molecular mechanisms by which FL exert a cytoprotective effect against oxidative stress in *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)-challenged RAW264.7 macrophages. Up-scale production reduced overall biological effectiveness of FL with the exception of inhibition of intracellular ROS generation. FL prevented *t*-BHP-induced cytotoxicity and intracellular accumulation of reactive oxygen species through activation of catalase expression via SAPK/JNK phosphorylation and Nrf2 nuclear translocation. Different oligopeptides, phenolic acids and flavonols were identified as contributors of the observed effects. To the best of our knowledge, we reported for the first time that FL attenuates oxidative stress cellular damage via activation of SAPK/JNK phosphorylation, Nrf2 nuclear translocation and antioxidant enzymes expression.

## 1. Introduction

The exponential increase of people affected by metabolic syndrome (MetS) has led the scientific community to explore new lifestyle interventions that effectively revert all components of this disease including central obesity, dyslipemia, elevated plasma glucose, blood pressure and insulin resistance (Grundy, 2016). Patients with MetS are more prone to develop type 2 diabetes mellitus, cardiovascular diseases and non-alcoholic fat liver disease (NAFLD). Impaired antioxidant status and consequent development of oxidative stress are also intimately related to MetS and its associated comorbidities (Zaki et al., 2018). Reactive oxygen species (ROS) mediate various signaling networks exerting cytotoxic effects, such as peroxidation of lipids and phospholipids and oxidative damage to proteins and DNA, leading to tissue destruction (Zaki et al., 2018).

Legume interventions become a subject of increasing interest since

they have shown beneficial properties related to the management of MetS (Martínez, et al., 2016). Legume intake has positive effects including glycemia and lipemia decrease and improvement of insulin sensitivity, weight management and satiety perception (Clark & Duncan, 2017; Mollard et al., 2012). Beside fiber and oligosaccharides, other bioactive compounds such as phenolic compounds and peptides have emerged as contributors to the positive effects of legume intake on MetS (Padhi, Liu, Hernandez, Tsao, & Ramdath, 2017; Padhi & Ramdath, 2017; Reverri et al., 2017). Health promoting properties of phenolic compounds and bioactive peptides of legumes come from their physiological effects such as modulation of blood pressure as well as glucose and lipid homeostasis given that they inhibit the activity of angiotensin converting enzyme I (ACE), intestinal  $\alpha$ -glucosidase, pancreatic  $\alpha$ -amylase and lipase (Iwaniak, Darewicz, & Minkiewicz, 2018; Zhang et al., 2015). They may also act as antioxidants providing protection against oxidative stress (García-Mora et al., 2017; Padhi et al.,

**Abbreviations:** ACE, angiotensin I converting enzyme; ACN, acetonitrile; ARE, antioxidant response element; *t*-BHP, *tert*-butyl hydroperoxide; DCF, dichlorofluorescein; DCFDA, dichlorofluorescein diacetate; DMEM, High-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium; FA, formic acid; FBS, Fetal bovine serum; FL, fermented lentil; FLD, fermented lentil digest; HRP, horse radish peroxidase; JNK, Jun amino-terminal kinase; NAFLD, non-alcoholic fat liver disease; Nrf2, nuclear factor like 2; MetS, metabolic syndrome; m-IgGk, mouse IgGk light chain binding protein; ORAC, oxygen radical absorbance capacity; PBS, phosphate buffer saline; PVDF, polyvinylidene fluoride; ROS, reactive oxygen species; SAPK, stress-activated protein kinases; SOD-1, Cu-Zn superoxide dismutase; TFA, trifluoroacetic acid; TBST, Tris buffer saline Tween 20

\* Corresponding author at: C/Juan de la Cierva 3 28006 Madrid, Spain.

E-mail address: [c.m.villaluenga@csic.es](mailto:c.m.villaluenga@csic.es) (C. Martínez-Villaluenga).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.012>

Received 15 March 2018; Received in revised form 12 July 2018; Accepted 2 September 2018

Available online 03 September 2018

0308-8146/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

2017).

Different technological strategies including germination and fermentation have been employed to exploit legumes as functional foods for the management of MetS (Bautista-Expósito, Peñas, Silván, Frias & Martínez-Villaluenga 2018; Kapravelou et al., 2017). We have recently developed a laboratory scale fermentation in alkaline conditions with *Lactobacillus plantarum* CECT 748 and the enzymatic preparation Savinase 16 L to increase the bioavailability of bioactive peptides and phenolics while enhancing the antioxidant, hypoglycemic, hypolipidemic, anti-inflammatory and anti-hypertensive activities of lentil (*Lens culinaris* Medik. var. Castellana) (Bautista-Expósito, Peñas, Silván et al., 2018). We demonstrated the individual effect of Savinase, mainly producing bioactive peptides, and *L. plantarum* responsible for the increased concentrations of *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid and kaempferol glucosides in the end-product (Bautista-Expósito, Peñas, Dueñas, Silván, Frias, & Martínez-Villaluenga, 2018b). Due to this lentil fermentation procedure is intended to be used for obtaining a new functional ingredient against MetS, we have studied herein the effect of up scaling the process on bioactive peptides, phenolics and bioactivity of the end-product.

The beneficial effects of fermented lentil (FL) developed by our research group were recently validated in the obese Zucker rat experimental model of MetS and NAFLD (Martínez et al., 2018). Administration of FL effectively reduced steatosis through the expression of genes involved in hepatic  $\beta$ -oxidation. Moreover, FL improved glucose and lipid metabolism and reduced lipid peroxidation in the liver of Zucker rats through increased gene expression of nuclear factor-erythroid-2-related transcription factor-2 (Nrf2). This transcription factor controls the expression of genes whose protein products are involved in the detoxication and elimination of reactive oxidants and electrophilic agents (Nguyen, Nioi, & Pickett, 2009). Since regulatory mechanisms of Nrf2 activation by FL have not been elucidated yet, in this study, we hypothesized that bioactive peptides and phenolic compounds present in FL activate redox signaling networks, induce Nrf2 translocation to the nucleus and subsequently the expression of antioxidant enzymes that would contribute to reduction of intracellular ROS levels and cell survival. To test this hypothesis, we performed *in vitro* experiments in which we simulated the gastrointestinal digestion of FL in physiological conditions and subsequently studied the antioxidant effects and mechanism of action of FL digest (FLD) using *tert*-butyl hydroperoxide-challenged RAW 264.7 cells as a model of oxidative stress.

The aims of this study were: i) to study the effect of scale-up fermentation process on the peptide and phenolic compounds yields and bioactive properties of the end-product; ii) to evaluate the protective role of FLD on *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) induced oxidative stress in RAW 264.7 macrophages; iii) to elucidate the molecular mechanisms involved in the protective effect of FLD against oxidative stress; iv) to characterize the peptide and phenolic profiles of FLD.

## 2. Material and methods

### 2.1. Materials

Lentil seeds (*Lens culinaris* Medik. var. Castellana) were obtained from Semillas Iglesias S.A. (Salamanca, Spain). A commercial food grade protease Savinase® 16 L (16 KNPU/g), an enzymatic preparation of alkaline-serine protease from *Bacillus* spp. was provided by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). *L. plantarum* CECT 748 was purchased from the Spanish Type Culture Collection (Valencia, Spain).

### 2.2. Chemicals

ACE (EC 3.4.15.1), rat intestine  $\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.20), porcine pancreatic lipase type II (EC 3.1.1.3), pepsin from porcine gastric mucosa (EC 3.4.23.1), pancreatin from porcine pancreas (EC 232-468-9), 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) and *t*-BHP were purchased

from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Murine macrophage cell line RAW 264.7 was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). High-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and penicillin/streptomycin (10,000 U/mL) were purchased from Lonza Group (Madrid, Spain). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Hyclone (GE Healthcare, Logan, UT, USA). Primary antibodies for Cu-Zn superoxide dismutase (SOD-1), catalase and  $\beta$ -actin were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), rabbit transcriptional activator Nrf2, Lamin B1, stress-activated protein kinases (SAPK)/Jun amino-terminal kinases (JNK) and phosphorylated SAPK/JNK in Thr183/Tyr185 were from Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA). Secondary antibodies [horseradish peroxidase (HRP)-conjugate recombinant mouse immunoglobulin G kappa (m-IgG $\kappa$ ) light chain binding protein and HRP-conjugate goat anti-rabbit IgG (heavy and light chain)] were obtained from Santa Cruz Biotechnology and Cell Signaling, respectively.

### 2.3. Scale-up of lentil flour fermentation

To scale-up production, in this study FL was produced in a 30 L final volume using a 50 L BIOSTAT® D bioreactor (Sartorius, Barcelona, Spain). Lentil flour was suspended in autoclaved water (142.7 g flour/L), inoculated with *Lactobacillus plantarum* CECT 748 ( $2 \times 10^8$  CFU/L) and simultaneously treated with Savinase 16 L (361 mg/L lentil flour suspension). Treatment was performed at 37 °C and pH 8.0 (adjusted using 20% KOH), continuous stirring speed of 300 rpm, without aeration for 15 h. Flour suspension was centrifuged and the obtained soluble fraction was frozen at  $-80$  °C and freeze-dried using FreeZone 12 L freeze-dryer (Labconco, Kansas, MO, USA).

### 2.4. Gastrointestinal digestion

FL was digested following an *in vitro* harmonized protocol that reached an international consensual agreement (Minekus et al., 2014). Briefly, freeze-dried lentil samples were dissolved in water (700 mg/5 mL) and, diluted with simulated gastric fluid containing pepsin (2000 U/mL in the final mixture, ratio of 50:50, v/v). The mixture was incubated at 37 °C in an orbital shaker at 150 rpm for 120 min. The enzymatic reaction was stopped by adjusting the pH at 7.0 with 1 M NaOH. Gastric phase was mixed with simulated intestinal fluid containing pancreatin (100 U trypsin activity/mL of final mixture, ratio 50:50, v/v) and porcine bile extract (10 mM in the final mixture). Intestinal digestion phase was carried out at 37 °C and 150 rpm for 120 min. The enzymatic reaction was stopped at 85 °C for 10 min. Digestion was performed in duplicate. FLD was freeze dried and kept at  $-20$  °C in vacuum sealed plastic bags until further analysis.

### 2.5. Determination of total peptides and phenolic compounds

Peptide concentration was measured by Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay kit (Fisher Scientific, Madrid, Spain) in permeates obtained by ultrafiltration through cellulose membranes of 10 kDa pore size (Millipore, Billerica, MA). Results were expressed as mg of peptides/g of soluble fraction. Total phenolic compounds were determined using the Folin-Ciocalteu method as previously described (García-Mora et al., 2015). The absorbance was read at 690 nm using a Synergy HT multi-well plate reader (BioTek, Winooski, VT, USA) and the results were expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/g of soluble fraction.

### 2.6. Peptides identification

A peptidomic analysis was performed to identify the peptides present in FLD. Twenty mg of freeze-dried sample were suspended in 1 mL of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) using and ultrasound bath. An aliquot (5  $\mu$ L) was 5-fold diluted in 0.1% TFA. From this sample solution

2.5  $\mu\text{L}$  were purified using a reverse phase C18 ZipTip (Millipore Corporation, MA, USA). Eluate was resuspended in 0.1% formic acid (FA)/2% acetonitrile (ACN) and injected (4  $\mu\text{L}$ ) in an Easy liquid chromatography 1000 nano system (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) coupled to an ion source with nanoelectrospray LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). For each analysis, the sample was loaded into a precolumn Acclaim PepMap 100 (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) and eluted in an AcclaimPepMap 100 C18 (250 mm long, 75  $\mu\text{m}$  inner diameter and 3  $\mu\text{m}$  particle size; Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). The mobile phase flow rate was 250 nL/min using 0.1% FA in water (solvent A) and 0.1% FA in ACN (solvent B). The gradient profile was set as follows: 0%–35% solvent B in 90 min, 35%–45% solvent B in 10 min, 45%–95% solvent B in 5 min; 95%–100% solvent B in 1 min, 100% solvent B in 4 min.

Mass spectrometry (MS) analysis was performed using a LTQ-Orbitrap Velos working in the positive mode. For ionization, 2000 V of liquid junction voltage and 270 °C capillary temperature was used. The full scan method employed a m/z 400–2000 mass selection, an Orbitrap resolution of 60,000 (at m/z 200), a target automatic gain control (AGC) value of  $3 \times 10^6$ , and maximum injection times of 100 ms. After the survey scan, the 15 most intense precursor ions were selected for ion fragmentation. Fragmentation was performed by collision-induced dissociation in the ionic trap using a normalized collision energy of 35%. MS/MS scans were acquired using a starting mass of m/z 100, AGC target of  $2 \times 10^5$ , resolution of 17,500 (at m/z 200), intensity threshold of  $8 \times 10^3$ , isolation window of 2 m/z units and maximum injection time of 100 ms. Charge state screening was enabled to reject unassigned, singly charged, and equal or more than seven protonated ions. A dynamic exclusion time of 45 s was used to discriminate against previously selected ions.

MS data were analyzed with Proteome Discoverer (version 1.4.1.14) (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) using standardized workflows. Mass spectra raw files were searched against *Lens culinaris* database files (NCBI, 427 sequences protein entries) using SEQUEST search engine. Precursor and fragment mass tolerance were set to 10 ppm and 0.5 Da, respectively. In the search parameters carbamidomethylation of cysteines and methionine oxidation were established as fixed modifications. Identified peptides were filtered using Percolator algorithm with a q-value threshold of 0.01.

## 2.7. Quantification and identification of phenolic compounds

Freeze-dried FLD soluble fraction (50 mg) was dissolved in 1 mL methanol:water (50:50, v/v). Sample solution was vortexed during 10 min and subsequently, centrifuged at  $10,000 \times g$  and 5 °C for 10 min. The supernatant was filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  polytetrafluoroethylene membrane (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Chromatographic analyses were performed in an Agilent high performance liquid chromatography (HPLC) 1100 series equipped with a G1312A binary pump, G1313 A autosampler, G1315B photodiode array detector, controlled by the Agilent software v. A.08.03 and G1322A degasser. Briefly, sample (20  $\mu\text{L}$ ) elution was carried out at a flow rate of 1 mL/min, on a Kinetex column (5  $\mu\text{m}$ , C18, 250  $\times$  4.6 mm; Phenomenex, Macclesfield, UK), with 1% FA in water (solvent A) and ACN (solvent B), starting with 5% B and installing a gradient to obtain 60% B at 37 min, 98% B at 40 min and 98% B at 42 min. HPLC was coupled to an ion-trap mass spectrometer equipped with an electrospray ionization system (ESI). The nebulizer pressure and flow rate of nitrogen were 65.0 psi and 11 L/min, respectively. The heated capillary and voltage were maintained at 350 °C and 3.5 kV, respectively. Mass scan and MS/MS daughter spectra were measured from m/z 100 to 1200. Collision-induced fragmentation experiments were performed in the ion trap using helium as the collision gas, and the collision energy was set at 50%. MS data were acquired in the negative ionization mode. The phenolics compounds in FLD were identified according to their UV spectrum, molecular mass, daughter ions, and fragmentation pattern. For quantitative analysis,

calibration curves were prepared by injection of known concentrations of different standard compounds obtained from Extrasynthese (Genay Cedex, France). Samples were analysed in duplicate. Data were expressed as  $\mu\text{g/g}$  of soluble fraction.

## 2.8. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activity

ACE inhibitory activity was measured following a previously described method (García-Mora et al., 2015). Fluorescence was read every minute for 30 min at emission and excitation wavelengths of 335 and 405 nm, respectively, in a microplate reader Synergy HT (BioTek, Winooski, VT, USA). The results were expressed as percent inhibition relative to the negative control having 100% enzymatic activity. All samples were analyzed in duplicate. IC<sub>50</sub> values (concentration of sample in mg/mL that inhibits 50% of the ACE activity) were calculated plotting the non-linear regression sigmoidal dose-response curves in GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 2.9. $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity

$\alpha$ -Glucosidase sucrase and maltase inhibitory activities of FL (1.7 mg/mL final concentration) was determined following a previously described method (Bautista-Expósito, Peñas, Silván et al., 2018). Glucose concentration in the reaction mixture was determined using the Amplex® Red glucose/glucose oxidase assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Absorbance was measured using a Synergy HT plate reader (BioTek, Winooski, VT, USA) at 560 nm. Glucose concentration was calculated using a linear standard curve (0–200  $\mu\text{M}$ ) from a freshly prepared 400 mM stock solution. All samples were analyzed in duplicate. Percent inhibition of sucrase and maltase activity of intestinal  $\alpha$ -glucosidase in the presence of lentil samples was calculated relative to the negative control having 100% enzyme activity.

## 2.10. Lipase inhibitory activity

The ability of FL (final concentration of 2 mg/mL) to inhibit porcine pancreatic lipase was evaluated using a previously reported method (Bautista-Expósito, Peñas, Silván et al., 2018). Lipase activity was determined by measuring the hydrolysis of *p*-nitrophenyl butyrate to *p*-nitrophenol at 405 nm using a microplate reader Synergy HT (BioTek, Winooski, VT, USA). All samples were analyzed in duplicate. Percent inhibition of lipase activity in the presence of lentil samples was calculated relative to the negative control having 100% enzyme activity.

## 2.11. Oxygen radical absorbance capacity

Radical scavenging activity was evaluated by fluorescence following the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay described previously (Bautista-Expósito, Peñas, Silván et al., 2018). Fluorescence was measured in a Synergy HT microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA) at emission and excitation wavelengths of 520 nm and 485 nm, respectively. A Trolox standard curve with a linear concentration range (0–160  $\mu\text{M}$ ) was prepared from a freshly made 1 mM stock solution. All samples were analyzed in duplicate. Results were expressed as mM of Trolox Equivalents (TE)/g of soluble fraction.

## 2.12. Cell culture

In a previous *in vivo* study, it was demonstrated that fermented lentil intervention was able to reduce lipid peroxidation in the liver of obese Zucker rats with NAFLD by increased expression of Nfr2 (Martínez et al., 2018). To get a deeper insight on the antioxidant mechanism of action of FL described in the obese Zucker rat we decided to use a murine cell model of oxidative stress. We selected a murine macrophage cell line, as pathophysiology of NAFLD is characterized by infiltration of macrophages to the hepatic tissue increasing oxidative

stress and inflammation (Dongiovanni, Lanti, Riso, & Valenti, 2016).

To test the cytoprotective effect of FLD in stressful conditions, a model of oxidative stress induced by a potent pro-oxidant was established based on previous studies (Lv et al., 2017). RAW 264.7 murine macrophages were cultured using DMEM supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin. Cells were maintained at a subconfluent density in 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks and incubated in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air incubator at 37 °C. The culture medium was changed every 2 days. In all experiments, cells were allowed to acclimate for 24 h before treatments.

### 2.13. Cell viability

RAW 264.7 cells were grown in 96-well plates (5 × 10<sup>4</sup> cells/well) for 24 h and stimulated with *t*-BHP (0.05, 0.1, 1.0 and 2.5 mM) for an additional 3 h. Additional experiments consisted of cell treatment with FLD (50, 75 and 100 µg/mL) for 18 h or FLD (50, 75 and 100 µg/mL) for 18 h and with 2.5 mM *t*-BHP for an additional 3 h. Each treatment was performed in triplicate to confirm reproducibility. Control cells incubated in serum-free medium served as negative control. Cell viability was determined using the Cell Titer 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Proliferation Assay kit from Promega (Madison, WI, USA). Medium was removed, cells were washed with phosphate buffer saline (PBS) and 100 µL of serum-free medium were added. Thereafter, 20 µL of Cell Titer 96<sup>®</sup> were added to each well for the quantification of the living metabolically active cells. After 45 min of incubation, absorbance was read at 515 nm employing a PowerWave™ XS microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA). The viability was calculated considering negative control (non-treated cells) as 100% viable.

### 2.14. Detection of intracellular ROS

Intracellular ROS were quantified by the dichlorofluorescein (DCF) assay. Macrophages (2 × 10<sup>5</sup> cells/well) were grown in clear bottom black 24 well-plates for 24 h. Cells were washed with PBS and incubated with 20 µM DCFDA for 30 min. After that, cells were washed with PBS and treated with *t*-BHP (0.05, 0.1, 1.0 and 2.5 mM) for an additional 3 h. Additional experiments consisted of cell treatment with FLD (50, 75 and 100 µg/mL) for 18 h or FLD (50, 75 and 100 µg/mL) for 18 h and 2.5 mM *t*-BHP for an additional 3 h. Each treatment was performed in triplicate to confirm reproducibility. Control cells incubated in serum-free medium served as negative control. ROS production was monitored for 3 h by fluorescence at an excitation and emission wavelengths of 485 nm and 530 nm, respectively, using a Synergy HT plate reader (BioTek, Winooski, VT, USA).

### 2.15. Whole cell lysates preparation

Upon completion of treatments, cells were washed with 500 µL of ice cold PBS to remove cellular debris. Cells were lysed with 100 µL RIPA lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitors cocktail (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and incubated for 5 min at 4 °C. The cells were dislodged using cell scrapers and vortexed for 5 min at 4 °C followed by centrifugation at 14,000 × g for 10 min at 4 °C. The pellet was discarded and the cell supernatant was transferred into pre-chilled tubes. The protein concentration of the whole cell lysates was measured using the Detergent Compatible Protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Whole cell lysates were stored at –80 °C until use.

### 2.16. Preparation of cytosolic and nuclear fractions

For Nrf2 and Lamin B1 Western blot analysis, nuclear proteins were extracted after 18 h of FLD treatment (50, 75 and 100 µg/mL). For Western blot analysis of phosphorylated (P)-SAPK/JNK and total (T)-SAPK/JNK, cytoplasmic proteins were extracted after 6 h of FLD

treatment (50, 75 and 100 µg/mL). Upon completion of treatments, cells were subsequently washed with 500 µL of ice cold PBS to remove cellular debris. To separate cytoplasmic and nuclear fractions, NE-PER nuclear extraction kit (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) was used following manufacturer's instructions. All steps were carried out on ice or at 4 °C. The protein concentration of nuclear and cytosolic fractions was measured using the Detergent Compatible Protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Nuclear or cytoplasmic fractions were stored at –80 °C until use.

### 2.17. Western blot

Expressions of SOD-1, catalase and β-actin were measured by western blot in the whole cell lysates. Nrf2 and Lamin B1 were measured in the nuclear fraction while P-SAPK/JNK and T-SAPK/JNK were measured in cytosolic fraction. Sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was run under denaturing conditions with 20 µg of protein loaded in 4–20% on NuPAGE<sup>®</sup> Novex 4–12% Bis-Tris Gels (Invitrogen, Madrid, Spain). Gels were placed in XCell-sure lock Mini-Cell and run under reducing conditions at 200 V. NuPAGE<sup>®</sup> MES-SDS and NuPAGE<sup>®</sup> LDS (Invitrogen, Madrid, Spain) were used as running and sample buffers, respectively. After protein separation by SDS-PAGE and transfer, polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (GE Healthcare, Logan, UT, USA) were blocked with 5% non-fat dry milk for 1 h at room temperature and washed with Tris buffer saline Tween 20 (TBST), three times for 10 min each. PVDF membranes were incubated in primary antibodies against SOD-1, catalase and β-actin, Nrf2 and Lamin B1, P-SAPK/JNK and T-SAPK/JNK overnight at 4 °C. After washing, secondary antibodies were added and incubated at room temperature for 2 h. After incubation and repeated washing, the PVDF membranes were prepared for detection using a 1:1 mixture of chemiluminescent reagent A (luminol solution) and B (peroxide solution) (GE Healthcare, Logan, UT, USA). The membrane pictures were taken on a ChemDoc XRS+ Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The relative amount of each target protein was normalized to β-actin. For the detection of Nrf2, equal amount of protein (15 µg) from nuclear extracts was normalized to Lamin B1. All Western blot procedures were determined in at least three independent trials.

### 2.18. Statistical analysis

Experimental data represent the mean and standard deviation of three replicates analyzed in duplicate. Statistical significance of the data was tested by one-way analysis of variance, followed by the Duncan test to compare the means that showed significant variation ( $p < 0.05$ ); all of the statistical analyses were performed using Statgraphics Plus software, version 5.1 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA).

## 3. Results

### 3.1. Effect of scale up on peptide and phenolic yields and bioactivity profile of FL

In an earlier study, FL was produced at laboratory scale using *L. plantarum* CECT 748 along with Savinase 16L at pH 8.5 for 15 h to enhance the multifunctional potential of lentil in relation to the management of hypertension, hyperglycemia, dislipemia and oxidative stress (Bautista-Expósito, Peñas, Silván et al., 2018). In the present study, we scale up FL production from 1.5 L to 30 L final volume with some minor modifications. As sodium may have a negative impact in blood pressure (Bazzano, Green, Harrison, & Reynolds, 2013), NaOH was substituted by KOH to adjust pH value during fermentation. Pilot scale fermentation was performed at pH 8.0 instead of pH 8.5, therefore, lower volume of alkali solution (20% KOH) were required to adjust the pH value.

**Table 1**

Effect of scale-up of fermentation from 1.5 to 30 L on peptide yield, total phenolic yield and bioactive profile of FL.

	1.5 L <sup>a</sup>	30 L
Protein (mg/g)	780.94 ± 61.52 <sup>b</sup>	480.42 ± 30.56 <sup>a</sup>
Peptides (mg/g)	230.0 ± 8.06 <sup>b</sup>	181.3 ± 17.70 <sup>a</sup>
Phenolics (mg GAE/g)	65.9 ± 5.60 <sup>b</sup>	49.2 ± 5.60 <sup>a</sup>
ACE inhibition (IC <sub>50</sub> , mg/mL)	0.14 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.01 <sup>b</sup>
<i>α</i> -glucosidase inhibition (%)		
Sucrase activity	53.24 ± 8.72 <sup>b</sup>	38.51 ± 1.38 <sup>a</sup>
Maltase activity	38.06 ± 0.17 <sup>a</sup>	36.26 ± 4.63 <sup>a</sup>
Lipase inhibition (%)	39.67 ± 3.64 <sup>b</sup>	26.69 ± 4.12 <sup>a</sup>
ORAC (mM TE/g)	508.8 ± 48.14 <sup>b</sup>	404.7 ± 18.56 <sup>a</sup>
Inhibition of ROS generation (%)	49.53 ± 4.56 <sup>a</sup>	66.60 ± 1.81 <sup>b</sup>

Data are the mean ± standard deviation of three replicates analyzed in duplicate. Different lowercase letters indicate statistical differences among treatments ( $p \leq 0.05$ , Duncan's test).

<sup>a</sup> Data reported in Bautista-Expósito, Peñas, Silván et al. (2018), Bautista-Expósito, Peñas, Dueñas et al. (2018).

Peptide and phenolic yields as well as bioactivity of FL produced at lab-scale and pilot-scale were compared as it is shown in Table 1. FL produced at pilot scale was comprised of 480.4 mg protein/g, 181.3 mg peptides/g and 49.2 mg GAE/g. As compared to lab-scale, FL production at 30 L scale significantly reduced protein content, peptide and phenolic yields ( $p < 0.05$ ). Similarly, FL bioactivity was significantly lower when the fermentation process was scaled up to 30 L. Lower inhibition of ACE, intestinal sucrase activity and pancreatic lipase as well as ORAC values were observed for FL produced at pilot scale. On the contrary, scale up of fermentation process did not affect maltase activity of FL and noticeably increased the effectiveness of FL to protect RAW 264.7 macrophages against oxidative stress ( $p > 0.05$ ; Table 1). Based on these results, to get a deeper insight in the protective effects of FL against oxidative stress we further performed an *in vitro* gastrointestinal digestion of FL to mimic physiological processes that upon intake have an impact on chemical composition and bioactivity. This experimental approach allowed us to compare our results with those previously observed in Zucker rats with MetS (Martinez et al., 2018). Thus, subsequent experiments were performed to investigate the protective effect and mechanisms of action of FLD in *t*-BHP-induced RAW 264.7 macrophages.

### 3.2. FLD protect RAW264.7 cells against *t*-BHP-induced cytotoxicity

To test the cytoprotective effect of FLD, a model of oxidative stress induced by a potent pro-oxidant such as *t*-BHP was used based on previous studies (Lv et al., 2017). *t*-BHP can induce cell damage, inhibiting cell viability and inducing cell apoptosis. Different *t*-BHP concentrations (0.05, 0.1, 1 and 2.5 mM) were tested to assure that toxicity by oxidative stress on RAW 264.7 macrophages was produced. Results show that 0.1, 1.0 and 2.5 mM of *t*-BHP resulted in a remarkable decrease of cell viability (78%, 39% and 11% respectively, Fig. 1A). Subsequently, macrophages were exposed to increasing concentrations of FLD (10, 50, 75 and 100 µg/mL) during 18 h and cell viability was measured. Cell viability of FLD-treated cells was not significantly different compared to control cells ( $p > 0.05$ , Fig. 1B), therefore, none of the tested concentrations of FLD induced cytotoxicity. To determine whether treatment with FLD has a cytoprotective effect against stressful oxidant conditions, cells were treated with FLD (10, 50, 75 and 100 µg/mL) for 18 h and subsequently exposed to 2.5 mM *t*-BHP for 3 h. Results showed that FLD at 75 and 100 µg/mL significantly inhibited *t*-BHP induced cell death (42% and 61%, respectively, Fig. 1C).

### 3.3. FLD attenuated *t*-BHP-triggered ROS production in RAW 264.7 cells

*t*-BHP exposure to RAW 264.7 cells increased in a dose-dependent

manner the production of ROS (Fig. 1D). Levels of oxidant radicals in cells treated with increasing concentrations of FLD did not show significant differences compared to control untreated cells ( $p > 0.05$ , Fig. 1E). These results indicate that FLD alone did not induce oxidative stress to RAW 264.7 macrophages. Pretreatment of RAW 264.7 cells with FLD (10, 50, 75 and 100 µg/mL) for 18 h followed by 2.5 mM exposure of *t*-BHP for 3 h dose-dependently reduced the generation of oxidant radicals (3, 19, 32 and 67% inhibition, respectively, Fig. 1F).

### 3.4. FLD induces catalase protein expression

To elucidate the possible molecular pathways of the anti-oxidant role of FLD, the protein expression of antioxidant enzymes (catalase and SOD-1) by Western blot was evaluated (Fig. 2A). Cell exposure to 0.1 mM *t*-BHP increased catalase and SOD-1 levels compared to control untreated cells ( $p < 0.05$ , Fig. 2B and C). The choice of *t*-BHP dose was based on higher cell viability (Fig. 1A). Pretreatment of cells with FLD (50, 75 and 100 µg/mL) for 18 h and subsequently with 0.1 mM *t*-BHP for 3 h further enhanced catalase protein expression in a dose-dependent manner as compared with *t*-BHP exposed cells ( $p < 0.05$ , Fig. 2B). Conversely, FLD did not increase SOD-1 expression induced by 0.1 mM pro-oxidant exposure ( $p > 0.05$ , Fig. 2C).

### 3.5. FLD induces the nuclear translocation of Nrf2

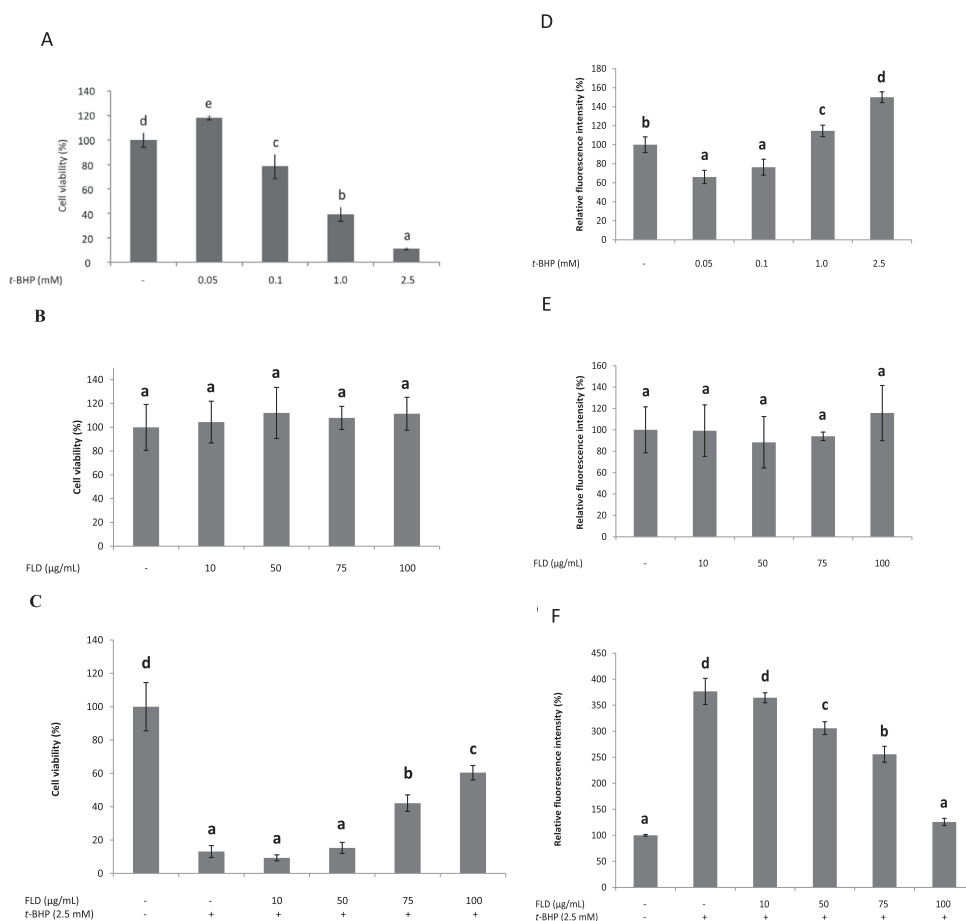
We investigated the effect of FLD in the expression and nuclear translocation of the transcription factor Nrf2 by Western blot (Fig. 2E). Accordingly, RAW 264.7 cells were pretreated with FLD (50, 75 and 100 µg/mL) for 18 h and subsequently with 0.1 mM *t*-BHP for 3 h and Nrf2 in nuclear fraction were measured by Western blot. Fig. 2F shows a dose dependent increase of Nrf2 levels in nuclear fraction ( $p < 0.05$ ).

### 3.6. FLD increases the phosphorylation of SAPK/JNK in RAW 264.7 macrophages

Because redox signaling mechanisms involve the activation of the stress-sensitive Ser/Thr systems (Evans, Goldfine, Maddux, & Grodsky, 2002), we examined the upstream signaling pathways involved in the activation of Nrf2 by determination of phosphorylation of SAPK/JNK. RAW 264.7 cells were treated with FLD (50, 75 and 100 µg/mL) for 6 h and Western blots were performed to detect T- and P-SAPK/JNK proteins (Fig. 3A). FLD-treated cells showed a significant and dose-dependent increase of phosphorylation of SAPK/JNK that was evident after 6 h (Fig. 3B). Conversely, no significant differences were observed in total levels of SAPK/JNK of FLD treated cells compared to control cells ( $p > 0.05$ , Fig. 3C). The ratio of phosphorylated versus total SAPK/JNK increased with FLD treatment in a dose-dependent manner ( $p < 0.05$ , Fig. 3D).

### 3.7. Characterization of FLD

Most abundant peptides in FLD are presented in Table 2. A total of 7 fragments with molecular masses within the range of 839 to 2768 Da were identified. These peptides derived from the major lentil proteins: convicilin, allergen Len c 1.0101 and vicilin type C. Table 3 shows the phenolic profile of FLD acquired by HPLC-ESI-DAD-MS<sup>n</sup> analysis in the negative-ion mode. A total of 9 unique mass signals were detected ranging from 258 to 741 Da. Of these, 8 compounds were tentatively identified based on spectral database matching as well as literature data (Dueñas et al., 2016). An unidentified compound with a mass/charge (m/z) ratio of 659 and mass fragments of 468 and 298 was the most abundant compound, reaching up to 846.5 µg/g in FLD. Phenolic acid derivatives such as feruloylquinic acid, gallic acid derivatives I and II and caffeic acid glucuronide were the greatest phenolic group identified in FLD, reaching up to 88.9, 72.1, 56.9 and 16.5 µg/g, respectively. The second most abundant phenolic compounds identified in FLD were the



**Fig. 1.** FLD reduces *t*-BHP-induced cell death (A-C) and intracellular redox status (D-F) in RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 macrophages were exposed to *t*-BHP (0.05, 0.1, 1.0 and 2.5 mM) for 3 h (A and D) FLD (50, 75 and 100 μg/mL) for 18 h (B and E) and FLD (50, 75 and 100 μg/mL) for 18 h followed by treatment with 2.5 mM *t*-BHP for 3 h (C and F). Cell viability was measured using a tetrazolium compound [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] and an electron coupling reagent (phenazine ethosulfate). Cell viability was expressed as relative percentage of control cells. Oxidant production was measured by DCF probe. Data were expressed relative percentage of fluorescence intensity in control cells. All results are expressed as means ± standard deviation of six independent experiments for each experimental condition. Different letters denote statistically significant differences ( $p < 0.05$ , Duncan test).

flavonols kaempferol rutinoside-rhamnoside and quercetin-glucuronide, which reached 51.0 and 32.3 μg/g, respectively.

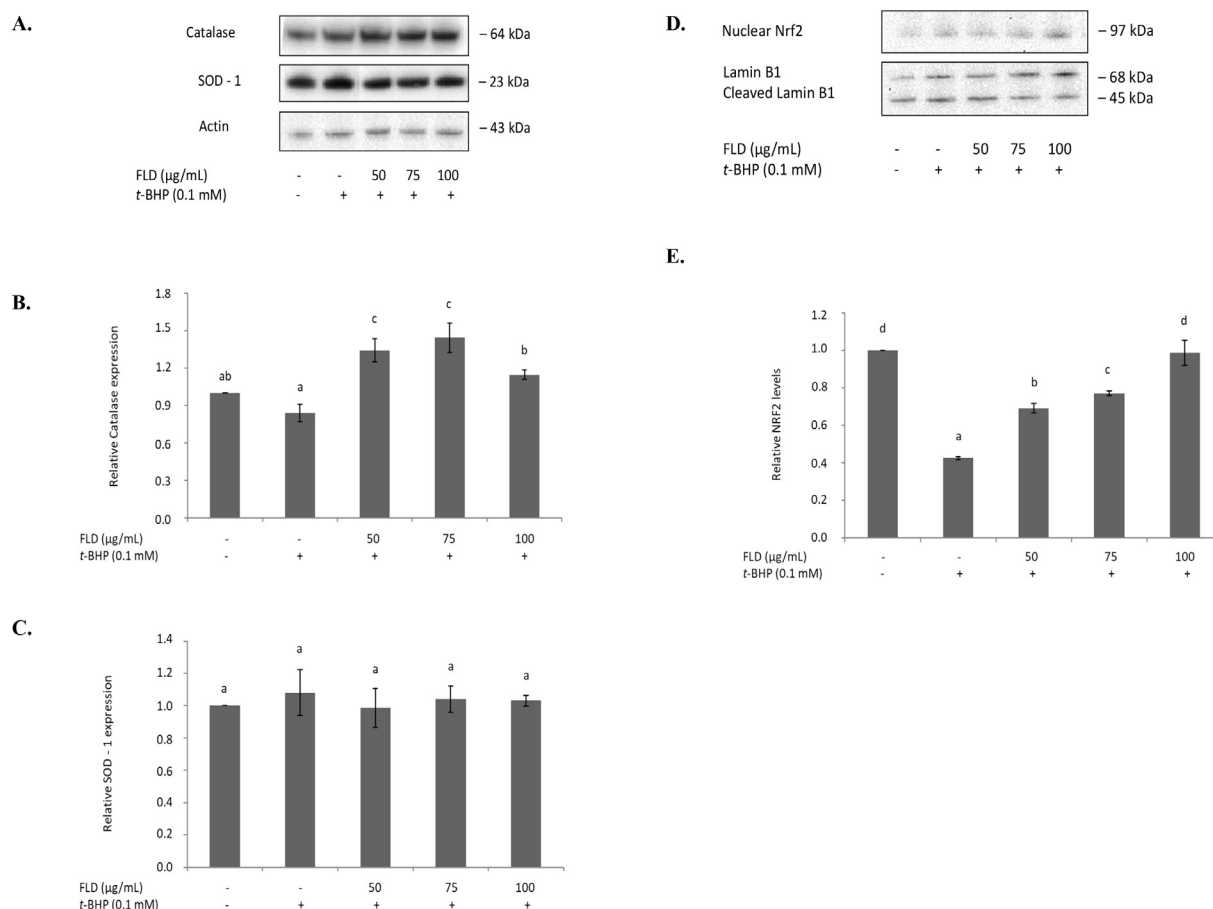
#### 4. Discussion

One of the purposes of this study was to scale up the production of FL and to investigate the impact of pilot scale production on peptide and phenolic contents as well as on bioactivity. Experimental results indicated that fermentation scale up from 1.5 L to 30 L moderately reduced the peptide and phenolic content as well as bioactivity of FL. These losses could be partially associated to the fact that FL production at pilot scale was performed in milder alkaline conditions (pH 8.0) as compared to lab-scale production (pH 8.5). These small changes in pH value could have a negative impact on Savinase protease activity (optimum pH 8.5) and subsequently on the generation of bioactive peptides, resulting in moderate losses of biological effectiveness. The lower phenolic content found in the soluble fraction of fermented lentil produced at pilot scale could be related to differences in fermentation conditions which may have an impact in solubilization of bound phenolic fraction mediated by microbial metabolism, Savinase (with feruloyl esterase side activity) and alkaline hydrolysis (Bautista-Expósito, Peñas, Silván et al., 2018; Bautista-Expósito, Peñas, Dueñas et al., 2018). Regarding antioxidant activity, what is suggested from our results is that upscale production of fermented lentil slightly reduced the ability to scavenge peroxy radicals through hydrogen donation while improved inhibition of intracellular ROS production most likely through activation of cellular antioxidant response. Antioxidant activity assays such as ORAC and inhibition of *t*-BHP induced cellular oxidative stress provide different information about mechanisms of action of antioxidant compounds. The former only measures the ability of an

antioxidant to quench free radicals (i.e. peroxy radical) by hydrogen donation stabilizing the peroxy radical by resonance (Granato et al., 2018). The latter evaluates the ability of compounds as modulators of cell signaling pathways related to activation of cellular antioxidant response (Granato et al., 2018). In order to test this hypothesis the effect of FL after gastrointestinal digestion on the activation of cellular antioxidant response was further examined.

Despite the moderate losses in bioactivity observed in the present work, a recent study demonstrated that FL produced in the same conditions described herein was efficient at ameliorating alterations in glucose and lipid metabolism and liver functionality in an experimental animal model of MetS and NAFLD (Martinez et al., 2018). In particular, FL was effective at improving all the parameters and indices related to insulin resistance (blood glucose, area under the curve after an oral glucose overload and profile curve, triglyceride/glucose index), lipid metabolism (plasmatic triglycerides, phospholipids and high density lipoprotein cholesterol levels, atherogenic index), hepatic steatosis (fat content, fatty acid composition) and oxidative stress (hepatic lipid peroxidation) in obese Zucker rats. These health benefits of FL were consistent with the *in vitro* antioxidant, intestinal α-glucosidase and pancreatic lipase inhibitory activities observed in the present study for FL and it could be attributed to the presence of bioactive peptides and phenolic compounds.

Accumulating scientific evidence demonstrates that MetS is associated with an impaired antioxidant status due to a general decrease of hepatic antioxidant enzymes and subsequent increase of lipid peroxidation in the liver (Martinez et al., 2018). Lipid peroxidation is the ROS-triggered metabolic process that results in the destruction of membrane lipids and tissue damage. Martinez et al. (Martinez et al., 2018) found that daily FL administration (1 g/kg) for 8 weeks reverted



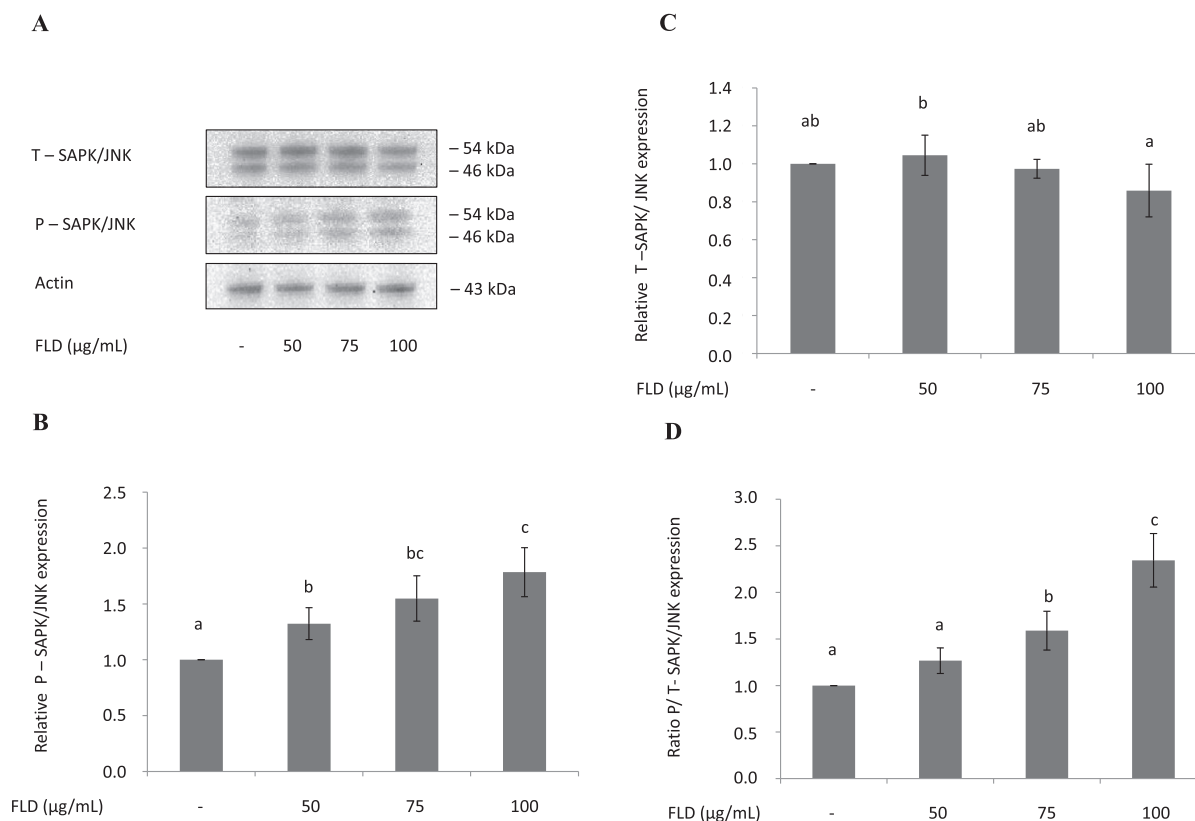
**Fig. 2.** FLD activates catalase protein expression (A–C) and Nrf2 nuclear translocation (D and E) in RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 macrophages were treated with FLD (50, 75 and 100 µg/mL) for 18 h followed by 0.1 mM *t*-BHP for 3 h. Following treatment, protein was harvested and immunoblotted for the indicated proteins. Representative Western blot of three different experiments (A and D). Protein expression of catalase, SOD-1 and Nrf2 were relative to untreated cells (B, C and E respectively). The intensities of catalase, SOD-1, Nrf2, Lamin B1 and  $\beta$ -actin was quantified using Bio-Rad Image Lab software. All results were expressed as means  $\pm$  standard deviation of three independent experiments. Different letters denote statistically significant differences ( $p < 0.05$ , Duncan test).

hepatic lipid peroxidation in the obese Zucker rat. With that knowledge, a second purpose of the current study was to investigate the protective effect of FL on *t*-BHP-induced oxidative stress in RAW 264.7 macrophages. Moreover, we determined whether these effects were associated to the activation of Nrf2-mediated antioxidant signaling pathways in RAW 264.7 macrophages. In this study, we demonstrated that FLD was able to counteract *t*-BHP-induced oxidative stress and cell death as well as to improve cellular antioxidant capacity of macrophages by increasing the activity of catalase via a mechanism that involves activation of SAPK/JNK and Nrf2 nuclear translocation. Thus, our results show for the first time the mechanisms of action of FLD to prevent oxidative damage in macrophages through the modulation of signaling pathways involved in antioxidant enzyme regulation.

We selected RAW 264.7 macrophages because it is well known that this cell line could own over-production of ROS following oxidant exposure (Zhang et al., 2018). Previous studies have shown that *t*-BHP exposure to RAW 264.7 macrophages reduced cell viability and promoted cell apoptosis and necrosis resulting from intracellular ROS generation (Lv et al., 2017). Similarly, we found that RAW 264.7 cells exposed to *t*-BHP altered intracellular redox milieu and decreased cell viability even at a relatively low level of *t*-BHP (0.1 mM). We have shown herein that cell pretreatment with FLD prevented the increase in intracellular ROS and promoted cell viability and survival of RAW 264.7 macrophages in a strong oxidant environment (2.5 mM *t*-BHP). These results are in agreement with an earlier study showing that FL administration to obese Zucker rats decreases hepatic thiobarbituric reactive species, a marker of lipid peroxidation (Martinez et al., 2018).

Accumulating evidence shows that cytoprotective effect of antioxidants may be linked to their ability to regulate the expression of antioxidant enzymes (Ramachandran & Saravanan, 2013). Expression of antioxidant enzymes is critical in the detoxication and elimination of ROS and electrophiles through conjugative reactions and by enhancing cellular antioxidant capacity. Our results revealed that pretreatment of RAW 264.7 macrophages with FLD and subsequent exposure to oxidant conditions enhanced the expression of catalase in RAW 264.7 macrophages as compared to non-stressed cells. Catalase catalyzes the conversion of hydrogen peroxide to water and oxygen (Finkel & Holbrook, 2000). Therefore, we proposed that the increased endogenous defense capacity evoked by FLD could be a critical determinant to protect against oxidative stress-induced injury. Similarly, early studies have found that legume (*Phaseolus vulgaris* L.) extracts displayed protective benefit to endogenous antioxidant enzymes such as SOD, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in human colonic carcinoma Caco-2 cells (Chen et al., 2017).

A major mechanism in the cellular defense against oxidative stress is activation of the Nrf2-antioxidant response element (ARE) signaling pathways (Nguyen et al., 2009). Activation of Nrf2 is dependent on mechanisms that increase its stability, leading to its accumulation in the cell. A well established mechanism that controls Nrf2 stability is mediated by Keap1 (Nguyen, Sherratt, Nioi, Yang, & Pickett, 2005). Nrf2 is targeted for degradation by Keap1 in the nucleus, a process that requires the transient shuttling of Keap1 into this compartment. In cells under stress, stabilization of Nrf2 is thought to be dependent on modifications of reactive cysteines in Keap 1 that reduce access of this



**Fig. 3.** FLD protective effect against oxidative stress involves MAPK activation. Total (T) and phosphorylated (P) SAPK/JNK were detected by Western blot in cytosolic lysates after RAW 264.7 macrophages treatment with FLD (50, 75 and 100 µg/mL) for 6 h. Following treatment, protein was harvested and immunoblotted for the indicated proteins. Representative Western blot image of T-SAPK/JNK and P-SAPK/JNK (A). T-SAPK/JNK and P-SAPK/JNK intensity relative to β-actin expressed as percentage relative to control cells (B). Ratio of P-SAPK/JNK vs. T-SAPK/JNK (C). The intensities of T-SAPK/JNK and P-SAPK/JNK and β-actin were quantified using Bio-Rad Image Lab software. All results were expressed as means ± standard deviation of three independent experiments. Different letters denote statistically significant differences ( $p < 0.05$ , Duncan test).

protein to Nrf2 (Kobayashi et al., 2006). We investigated the mode of action of FLD to induce the antioxidant defense via Nrf2 activation in RAW 264.7 macrophages. In the present study, we observed that FLD pretreatment of cells clearly induces the nuclear translocation and dose-dependent accumulation of Nrf2, a necessary event to exert its activity. These results were consistent with the increase of catalase gene expression and suggest a clear regulatory mechanism promoting Nrf2 stabilization in response to FLD and induction of ARE-mediated antioxidant enzymes gene expression. Similarly, fermented powder of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) was able to regulate antioxidant and detoxifying enzymes through the Nrf2 pathway, and reduce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced endoplasmic reticulum (ER) stress (La Marca et al., 2015).

Nrf2 activation by phosphorylation at specific serine and/or tyrosine residues has also been reported to be mediated by upstream signaling pathways such as mitogen activated protein kinases (MAPK), phosphatidylinositol-3-kinases/protein kinase B or protein kinase C δ (Lv et al., 2017; Nitire, Khatri, & Jaiswal, 2014). As with other

**Table 3**

Retention times (Rt) and mass spectrometric data of molecular ions and main observed fragments of phenolic compounds in FLD.

Rt (min)	Tentative identification	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	µg/g
2.5	Caffeic acid glucuronide	355	179	16.5 ± 2.1
2.7	Gallic acid derivative I	257	169	72.1 ± 5.8
2.9	Gallic acid derivative II	257	169	56.9 ± 3.0
3.3	Feruloylquinic acid	367	194	88.9 ± 5.5
14.7	Unknown	659	468, 298	846.5 ± 9.3
15.1	Quercetin-Glucuronide	477	301	32.3 ± 0.3
17.9	Kaempferol rutoside-rhamnoside	740	593, 285	51.0 ± 5.7
TOTAL				1201.6 ± 55.9

Data are the mean ± standard deviation of three replicates analyzed in duplicate.

**Table 2**  
Peptides identified in FLD.

Protein group accessions	Sequence	Parent proteins	MH <sup>+</sup> (Da)
7,688,242	EQSPGQWRPSHGKEEDEEEKEQK	Convicilin f(57–79)	2767.26
29,539,109	NILEAAFNTYEYEEIEK	Allergen Len c 1.0101f(153–168)	1912.92
854,243	SDQDNPFIFESK	Vicilin type C f(30–41)	1426.65
7,688,242	HGDPEER	Convicilin f(111–117)	839.37
7,688,242	EQSPGQWRPSHGKEEDEEEK	Convicilin f(57–76)	2382.06
7,688,242	FFEVTPEK	Convicilin f(393–400)	996.50
545,690,146	MQEGSLMQMAK	Acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase β-subunit f(405–417)	1453.68

members of the MAPK family, JNK is activated upon dual phosphorylation on a Thr-Pro-Tyr motif, which is activated by phosphorylation on serine and threonine residues by an upstream kinase (MKK4 and MKK7) (Davis, 1999). Therefore, to identify upstream regulatory mechanisms involved in the nuclear accumulation of Nrf2 by FLD, the effect on the phosphorylated levels of SAPK/JNK were also examined in the present study. We found that FLD induced the phosphorylation of SAPK/JNK, therefore, these results suggest that the activation of this pathway could be linked to Nrf2 activation. The present study demonstrates for the first time that FLD induces the expression of antioxidant enzymes through a mechanism involving activation of Nrf2/MAPK pathways.

Lentil is a source of bioactive peptides and phenolic compounds with antioxidant activity, therefore, the last purpose of the present study was to establish a relationship between the cytoprotective effect of FLD against *t*-BHP induced oxidative stress in RAW 264.7 macrophages and FLD peptide and phenolic composition. HPLC-MS/MS analysis allowed the identification of 7 peptides in FLD derived from the main lentil proteins (convicilin, convicilin, allergen Len c 1.0101 and vicilin type C). Two of these sequences derived from convicilin (EQSPGQWRPESHGKEEDEEEK and EQSPGQWRPESHGKEEDEEEKQK) were previously found in FL which was indicative of the resistance of these peptides to *in vitro* gastrointestinal digestion simulating physiological conditions (Bautista-Expósito, Peñas, Dueñas et al., 2018). Structure-activity relationship analysis revealed that amino acid sequences containing proline, histidine or tyrosine within the sequence and hydrophobic amino acids at the N-terminus and/or C-terminus are determinant for the antioxidant activity (Li & Li, 2013). Moreover, it has been shown that amino and carboxylic group of acidic (aspartic acid and glutamic acid) and basic (arginine, lysine and histidine) amino acids act as metal chelators (Díaz, Dunn, McClements, & Decker, 2003). These structural features were found in most of the peptides collected in Table 2. Therefore, it can be assumed that lentil derived peptides in FLD identified in the present study could have contributed to reduction of intracellular ROS levels in *t*-BHP-induced macrophages through their radical scavenging activity. In addition, there is accumulating evidence pointing out that legume derived oligopeptides could exert an indirect antioxidant mechanism through the activation of the cellular antioxidant system. In particular, the chickpea-derived peptide NRYHE upregulates Nrf2 expression and participates in the ARE-mediated activation of antioxidant enzymes including NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, heme oxygenase 1,  $\gamma$ -glutamyl cysteine synthetase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated HT-29 and Caco-2 cells (Guo, Zhang, Jiang, Miao, & Mu, 2014).

The antioxidant activity of lentil derived peptides can be potentiated by the variety of phenolic compounds identified in FLD. Phenolic acids were the most prominent phenolic compounds in FLD followed by flavonols. Our results contrast with the phenolic profile of non-digested FL that is mainly made up of flavonols (kaempferol aglycone and glucosides, isorhamnetin glucuronide), followed by flavan-3-ols [(+)-catechin-3-*O*-glucoside, prodelphinidin dimer and (+)-catechin] and minor amounts of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic compounds (Bautista-Expósito, Peñas, Dueñas et al., 2018). The differences observed in the phenolic profile of FLD could be attributed to instability of flavonols and flavan-3-ols to pH changes during the different stages of gastrointestinal digestion (Bautista-Expósito, Peñas, Dueñas et al., 2018). Earlier studies have shown that phenolic compounds present in FLD are able to neutralize radicals and chelate metal ions through hydrogen, electron donating and mixed mechanisms (Ganesan & Xu, 2017). However, only some of them have been proven as Keap1-Nrf2 activators. For instance, kaempferol aglycone and glucosides have shown to exert protective effects against oxidative stress through activation of Nrf2-mediated defensive response in lung tissues (Kim, Im, Lee, & Chae, 2017; Kumar, Kim, More, Kim, & Choi, 2014). Similarly, gallic acid, quercetin and quercetin glucoside protects against oxidative stress-induced hepatotoxicity by activation of the Keap1-Nrf2 pathway (Feng, Wang, He, Yang, & Wan, 2017; Joko

et al. 2017; Kim et al., 2017). Structure-activity relationship analysis revealed that compounds bearing phenolic hydroxyl groups are biofunctional antioxidants that exert protective role by scavenging hazardous oxidants and inducing cytoprotective enzymes (Dinkova-Kostova & Talalay, 2008).

## 5. Conclusions

In summary, we have shown that FLD composed of antioxidant peptides and phenolic compounds is able to enhance the cellular antioxidant defense capacity, thereby, protecting macrophages from oxidative stress. FLD reverted *t*-BHP-induced cytotoxicity and ROS production through activation of SAPK/JNK phosphorylation followed by nuclear accumulation and transactivation and the subsequent expression of catalase. All these events were essential to maintain cellular redox homeostasis and prevent oxidative stress cell damage.

## 6. Funding sources

The research leading to these results received funding from Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, Spain) and FEDER program [grant number AGL2013-43247-R] and Spanish National Research Council [grant number 201670I044]. E. P. acknowledges to MINECO and European Social Fund for her “Ramón y Cajal” contract.

## 7. Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Bautista-Expósito, S., Peñas, E., Dueñas, M., Silván, J. M., Frias, F., & Martínez-Villaluenga, C. (2018). Individual contributions of Savinase and Lactobacillus plantarum to lentil functionalization during alkaline pH-controlled fermentation. *Food Chemistry*, 257, 341–349.
- Bautista-Expósito, S., Peñas, E., Silván, J. M., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2018). pH-controlled fermentation in mild alkaline conditions enhances bioactive compounds and functional features of lentil to ameliorate metabolic disturbances. *Food Chemistry*, 248, 262–271.
- Bazzano, L. A., Green, T., Harrison, T. N., & Reynolds, K. (2013). Dietary approaches to prevent hypertension. *Current Hypertension Reports*, 15(6), 694–702.
- Chen, P. X., Zhang, H., Marcone, M. F., Pauls, K. P., Liu, R., Tang, Y., ... Tsao, R. (2017). Anti-inflammatory effects of phenolic-rich cranberry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) extracts and enhanced cellular antioxidant enzyme activities in Caco-2 cells. *Journal of Functional Foods*, 38, 675–685.
- Clark, S., & Duncan, A. M. (2017). The role of pulses in satiety, food intake and body weight management. *Journal of Functional Foods*, 38, 612–623.
- Davis, R. J. (1999). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. In *Biochemical Society Symposium*, vol. 64 (pp. 1–12).
- Díaz, M., Dunn, C. M., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2003). Use of casein ophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2365–2370.
- Dinkova-Kostova, A. T., & Talalay, P. (2008). Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(SUPPL. 1), S128–S138.
- Dongiovanni, P., Lanti, C., Riso, P., & Valenti, L. (2016). Nutritional therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 29, 1–11.
- Dueñas, M., Sarmiento, T., Aguilera, Y., Benitez, V., Mollá, E., Esteban, R. M., & Martín-Cabrejas, M. A. (2016). Impact of cooking and germination on phenolic composition and dietary fibre fractions in dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and lentils (*Lens culinaris* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 66, 72–78.
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, 23(5), 599–622.
- Feng, R. B., Wang, Y., He, C., Yang, Y., & Wan, J. B. (2017). Gallic acid, a natural polyphenol, protects against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity by activating ERK-Nrf2-Keap1-mediated antioxidative response. *Food and Chemical Toxicology*.
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239–247.
- Ganesan, K., & Xu, B. (2017). Polyphenol-rich lentils and their health promoting effects. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11).
- García-Mora, P., Frias, J., Peñas, E., Zieliński, H., Giménez-Bastida, J. A., Wiczowski, W., ... Martínez-Villaluenga, C. (2015). Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) proteins by subtilisins. *Journal of Functional Foods*,

- 18, Part, A, 319–332.
- García-Mora, P., Martín-Martínez, M., Angeles Bonache, M., González-Múniz, R., Peñas, E., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2017). Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. *Food Chemistry*, 221, 464–472.
- Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L. D., Hidalgo, F. J., ... Finglas, P. (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chemistry*, 264, 471–475.
- Grundy, S. M. (2016). Metabolic syndrome update. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 26(4), 364–373.
- Guo, Y., Zhang, T., Jiang, B., Miao, M., & Mu, W. (2014). The effects of an antioxidative pentapeptide derived from chickpea protein hydrolysates on oxidative stress in Caco-2 and HT-29 cell lines. *Journal of Functional Foods*, 7(1), 719–726.
- Iwaniak, A., Darewicz, M., & Minkiewicz, P. (2018). Peptides derived from foods as supportive diet components in the prevention of metabolic syndrome. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 63–81.
- Joko, S., Watanabe, M., Fuda, H., Takeda, S., Furukawa, T., Hui, S.-P., ... Chiba, H. (2017). Comparison of chemical structures and cytoprotection abilities between direct and indirect antioxidants. *Journal of Functional Foods*, 35, 245–255.
- Kapravelou, G., Martínez, R., Nebot, E., López-Jurado, M., Aranda, P., Arrebola, F., ... Porres, J. M. (2017). The combined intervention with germinated vigna radiata and aerobic interval training protocol is an effective strategy for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and other alterations related to the metabolic syndrome in Zucker rats. *Nutrients*, 9(7).
- Kim, K. M., Im, A. R., Lee, S., & Chae, S. (2017). Dual protective effects of flavonoids from *Petasites japonicus* against UVB-induced apoptosis mediated via HSF-1 activated heat shock proteins and Nrf2-activated heme oxygenase-1 pathways. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40(6), 765–773.
- Kobayashi, A., Kang, M. I., Watai, Y., Tong, K. I., Shibata, T., Uchida, K., & Yamamoto, M. (2006). Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Molecular and Cellular Biology*, 26(1), 221–229.
- Kumar, H., Kim, I. S., More, S. V., Kim, B. W., & Choi, D. K. (2014). Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Natural Product Reports*, 31(1), 109–139.
- La Marca, M., Pucci, L., Bollini, R., Russo, R., Sparvoli, F., Gabriele, M., & Longo, V. (2015). Antioxidant effect of a fermented powder of Lady Joy bean in primary rat hepatocytes. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 20(1), 102–116.
- Li, Y. W., & Li, B. (2013). Characterization of structure-antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: Key sequence positions and their amino acid properties. *Journal of Theoretical Biology*, 318, 29–43.
- Lv, H., Liu, Q., Zhou, J., Tan, G., Deng, X., & Ci, X. (2017). Daphnetin-mediated Nrf2 antioxidant signaling pathways ameliorate tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)-induced mitochondrial dysfunction and cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, 106, 38–52.
- Martinez, R., Kapravelou, G., Donaire, A., Lopez-Chaves, C., Arrebola, F., Galisteo, M., ... Lopez-Jurado, M. (2018). Effects of a combined intervention with a lentil protein hydrolysate and a mixed training protocol on the lipid metabolism and hepatic markers of NAFLD in Zucker rats. *Food & Function*, 9, 830–850.
- Martínez, R., López-Jurado, M., Wanden-Berghe, C., Sanz-Valero, J., Porres, J. M., & Kapravelou, G. (2016). Beneficial effects of legumes on parameters of the metabolic syndrome: A systematic review of trials in animal models. *British Journal of Nutrition*, 116(3), 402–424.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvitto, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodtkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124.
- Mollard, R. C., Luhovyy, B. L., Panahi, S., Nunez, M., Hanley, A., & Anderson, G. H. (2012). Regular consumption of pulses for 8 weeks reduces metabolic syndrome risk factors in overweight and obese adults. *British Journal of Nutrition*, 108(SUPPL. 1), S111–S122.
- Nguyen, T., Nioi, P., & Pickett, C. B. (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13291–13295.
- Nguyen, T., Sherratt, P. J., Nioi, P., Yang, C. S., & Pickett, C. B. (2005). Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *Journal of Biological Chemistry*, 280(37), 32485–32492.
- Niture, S. K., Khatra, R., & Jaiswal, A. K. (2014). Regulation of Nrf2 – An update. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 36–44.
- Padhi, E. M. T., Liu, R., Hernandez, M., Tsao, R., & Ramdath, D. D. (2017). Total polyphenol content, carotenoid, tocopherol and fatty acid composition of commonly consumed Canadian pulses and their contribution to antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 38, 602–611.
- Padhi, E. M. T., & Ramdath, D. D. (2017). A review of the relationship between pulse consumption and reduction of cardiovascular disease risk factors. *Journal of Functional Foods*, 38, 635–643.
- Ramachandran, V., & Saravanan, R. (2013). Asiatic acid prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Functional Foods*, 5(3), 1077–1087.
- Reverri, E. J., Randolph, J. M., Kappagoda, C. T., Park, E., Edirisinghe, I., & Burton-Freeman, B. M. (2017). Assessing beans as a source of intrinsic fiber on satiety in men and women with metabolic syndrome. *Appetite*, 118, 75–81.
- Zaki, M., Kamal, S., Basha, W. A., El-Toukhy, S., Yousef, W., El-Bassouini, H. T., & Azmy, O. (2018). Assessment of DNA damage in obese premenopausal women with metabolic syndrome. *Gene Reports*, 10, 42–46.
- Zhang, B., Deng, Z., Ramdath, D. D., Tang, Y., Chen, P. X., Liu, R., ... Tsao, R. (2015). Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chemistry*, 172, 862–872.
- Zhang, X.-T., Sun, X.-Q., Wu, C., Chen, J.-L., Yuan, J.-J., Pang, Q.-F., & Wang, Z.-P. (2018). Heme oxygenase-1 induction by methylene blue protects RAW264.7 cells from hydrogen peroxide-induced injury. *Biochemical Pharmacology*, 148, 265–277.

# **Discusión general**





## 5. DISCUSIÓN GENERAL

El SMet se ha convertido en la actualidad en un problema de salud pública a nivel mundial (Santhekadur y col., 2017), ya que afecta al 25% de la población adulta e incrementa el riesgo de padecer otras enfermedades crónicas como la DMT2 y enfermedades cardiovasculares en mayor medida que sus componentes individuales (Rodríguez-Monforte y col., 2017). Los cambios del estilo de vida hacia el consumo de dietas saludables y el incremento de la actividad física constituyen la principal estrategia de intervención primaria para prevenir este síndrome (Grosso y col., 2017). Dentro de las intervenciones dietéticas, el consumo de alimentos multifuncionales enriquecidos en compuestos bioactivos puede proporcionar beneficios adicionales en la reversión de todas las disfunciones metabólicas asociadas al SMet.

Estudios recientes han puesto de manifiesto que el consumo regular de legumbres, como la lenteja, ofrece no solo beneficios nutricionales, sino que, además, previene las alteraciones metabólicas asociadas al SMet (Martínez y col., 2016), debido a que contienen una amplia gama de compuestos bioactivos. Entre ellos, cabe destacar, la presencia de compuestos fenólicos, fundamentalmente ácidos fenólicos, catequinas, proantocianidinas y flavonoles que son capaces de neutralizar radicales libres (Alshikh y col., 2015), inhibir la expresión de moléculas pro-inflamatorias (Zhang y col., 2017a) y modular la actividad de enzimas implicadas en el metabolismo lipídico y de la glucosa (Zhang y col., 2015). Además, se han identificado péptidos bioactivos derivados de diversas proteínas de lenteja como legumina, vicilina y convicilina con actividades antioxidante y antihipertensiva *in vitro* (García-Mora y col., 2015a, 2017). La presencia de estos compuestos, junto con otros como el almidón resistente o la fibra dietética, convierten a la lenteja en un ingrediente interesante en el desarrollo de alimentos multifuncionales dirigidos a atenuar el SMet.

El estudio de tecnologías de procesado que mejoren los efectos beneficiosos para la salud de las legumbres constituye un área de investigación emergente de gran interés. La hidrólisis enzimática y la fermentación son procesos con gran potencial para mejorar las propiedades funcionales de las legumbres al incrementar el contenido y bioaccesibilidad de sus compuestos bioactivos. En este sentido, se ha demostrado que la hidrólisis de proteínas de lenteja y judía pinta con enzimas de grado alimentario procedentes de *Bacillus* spp. libera péptidos bioactivos y compuestos fenólicos unidos a componentes de la pared celular, con propiedades antioxidantes y antihipertensivas (García-Mora y col., 2014, 2015a,b, 2017). De forma similar, la fermentación con BAL es una estrategia prometedora para potenciar el contenido de compuestos fenólicos libres y producir péptidos bioactivos en legumbres, incrementando así su potencial antioxidante y antihipertensivo (Jakubczyk y col., 2017;

Kapravelou y col., 2015; Limón y col., 2015; Torino y col., 2013). Sin embargo, existen ciertas desventajas que limitan el empleo del proceso de fermentación ácido láctica en legumbres. En primer lugar, la mayor parte de especies de BAL tienen una actividad proteolítica reducida que dificulta la liberación de péptidos bioactivos a partir de las proteínas. En segundo lugar, la disminución del pH que tiene lugar durante este proceso reduce la solubilidad de las proteínas y compuestos fenólicos presentes en las legumbres. La combinación de fermentación con BAL a pH controlado e hidrólisis enzimática con enzimas de grado alimentario permitiría superar estas limitaciones, mejorando las propiedades bioactivas de las legumbres. En este sentido, no existen estudios hasta el momento que hayan explorado esta estrategia combinada en legumbres para mejorar las propiedades promotoras de la salud y, en concreto, las relacionadas con la prevención del SMet. Hay que señalar que el empleo de una estrategia combinada de fermentación e hidrólisis enzimática para la obtención de un ingrediente/alimento multifuncional, requiere la realización de una optimización de las condiciones del proceso. El pH y tiempo de fermentación son variables que tienen gran influencia en el contenido y biodisponibilidad de los compuestos bioactivos de los alimentos y, por tanto, en las bioactividades del ingrediente desarrollado.

En este capítulo se discutirán los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, que se ha desarrollado en cuatro fases diferentes. En primer lugar, se ha evaluado el efecto individual y combinado de los procesos de fermentación con *Lactobacillus plantarum* a pH controlado (neutro o ligeramente alcalino) e hidrólisis enzimática con la enzima Savinasa 16 L (enzima comercial procedente de *Bacillus* spp.) sobre el contenido y bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y péptidos bioactivos en lenteja castellana, así como su viabilidad para la obtención de la fracción soluble o ingrediente multifuncional dirigido a reducir los riesgos asociados al SMet (fase I, publicaciones 1 y 2). En segundo lugar, se discutirán los resultados relativos a la optimización de las condiciones (pH y tiempo) del proceso combinado de fermentación e hidrólisis enzimática mencionado, con el fin de maximizar las propiedades funcionales del ingrediente desarrollado a partir de lenteja castellana (fase II, publicación 3). Posteriormente, se comentará el efecto del escalado a nivel de planta piloto del proceso combinado de fermentación e hidrólisis enzimática en las condiciones determinadas como óptimas en la fase II, sobre el contenido y bioaccesibilidad de compuestos bioactivos y actividad biológica del ingrediente obtenido (fase III, publicación 3). Por último, se discutirán los datos referentes al estudio de los mecanismos de acción antioxidante del ingrediente desarrollado a escala de planta piloto en las condiciones óptimas del proceso de fermentación,

estudio que ha incluido la evaluación de la influencia de la DGI simulada del ingrediente de lenteja sobre su actividad multifuncional (fase IV, publicación 4).

### **5.1. FASE I: Estudio del efecto individual y combinado de los procesos de fermentación e hidrólisis enzimática a pH controlado en el perfil de compuestos bioactivos y potencial multifuncional de la fracción soluble de lenteja (publicaciones 1 y 2).**

En la primera fase de la presente Tesis Doctoral se ha evaluado la viabilidad del proceso combinado de fermentación en estado líquido con *L. plantarum* e hidrólisis con una proteasa comercial (Savinasa® 16 L) como proceso de funcionalización de la harina de lenteja. Para ello, se ha estudiado el efecto de dos procesos independientes de fermentación realizados en condiciones diferentes: i) fermentación en condiciones ligeramente alcalinas y tiempos relativamente cortos (pH 8,5 durante 15 h) (publicación 1) y ii) fermentación en condiciones neutras y tiempos más largos (pH 6,8 durante 25,5 h) (publicación 2).

La novedad de estos estudios radica en el desarrollo de procesos de fermentación a pH constante cercano al pH neutro (6,8) o ligeramente alcalino (8,5) que, como se había demostrado previamente, mejora la solubilidad de proteínas, péptidos bioactivos y compuestos fenólicos presentes en las harinas procedentes de legumbres (Limón y col., 2015), así como las actividades enzimáticas responsables de la síntesis y biotransformación de compuestos bioactivos durante la fermentación. Se seleccionó la serín-proteasa Savinasa® 16 L como enzima a emplear en el proceso hidrolítico debido a que estudios previos han puesto de manifiesto que su actividad óptima se encuentra a pHs en el rango 6,5-11 y temperaturas en el rango 10-65 °C, compatibles con los que se pretendían utilizar en el proceso de fermentación. Además, esta enzima ha demostrado tener alta eficiencia en la liberación de péptidos bioactivos y compuestos fenólicos unidos a proteínas o polisacáridos de la pared celular en harina de lenteja (García-Mora y col., 2014). Como cultivo iniciador en el proceso fermentativo se empleó la cepa *L. plantarum* CECT 748 debido a que esta cepa produce carbohidrolasas,  $\beta$ -glucosidasas y esterasas extracelulares que son efectivas en la liberación de compuestos fenólicos unidos a componentes de la pared celular (Esteban-Torres y col., 2015; Muñoz y col., 2016), mejorando su bioaccesibilidad y, por tanto, su potencial actividad biológica.

### 5.1.1. Efecto del procesado (hidrólisis enzimática, fermentación ácido láctica o combinación de ambos procesos) en el contenido y composición peptídica y fenólica de la fracción soluble de lenteja.

En la fase I de esta Tesis Doctoral se evaluó, en primer lugar, el impacto de los procesos de hidrólisis con Savinasa (HS), fermentación con *L. plantarum* (FLP) o la combinación de ambos procesos (FLPS) sobre la concentración de péptidos en la fracción soluble obtenida a partir de la harina de lenteja en las dos condiciones de pH y tiempo mencionadas (publicaciones 1 y 2). Los resultados obtenidos mostraron que los procesos HS y FLPS causaron un aumento drástico del contenido de péptidos en la fracción soluble, que fue significativamente ( $p \leq 0,05$ ) superior al producido por el proceso de fermentación (FLP). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos previamente que demostraban que la enzima Savinasa es una de las proteasas comerciales más efectivas para hidrolizar las proteínas de lenteja (García-Mora y col., 2014). Así mismo, estudios recientes han demostrado que *L. plantarum* puede liberar péptidos a partir de proteínas de diferentes legumbres (Singh y Vij, 2017; Jakubczyk y col., 2017). La menor liberación de péptidos tras el proceso FLP observada en comparación con los otros dos procesos se puede atribuir a la ausencia en el genoma de *L. plantarum* del gen que codifica la proteasa de pared celular PrtP, implicada en la hidrólisis de proteínas a oligopéptidos. Sin embargo, esta bacteria tiene sistemas transportadores de péptidos (Opp y Dtp) y produce una amplia gama de peptidasas intracelulares que le permite crecer en presencia de oligopéptidos. Por tanto, la producción de péptidos a partir de proteínas de lenteja en el proceso combinado (FLPS) puede atribuirse fundamentalmente a la hidrólisis proteica por la Savinasa. La producción de péptidos fue superior en el proceso llevado a cabo a pH 8,5 durante 15 h (publicación 1) que en aquel realizado a pH 6,8 durante 25,5 h (publicación 2). Estos resultados pueden atribuirse a la mayor actividad proteasa de la enzima Savinasa a pHs alcalinos que a pHs ligeramente ácidos.

En esta fase se estudió, además, la composición fenólica de la fracción soluble de la harina de lenteja no procesada (control), así como de aquella sometida a los tres procesos mencionados (FLP, HS y FLPS). La fracción soluble de harina control a pH alcalino (publicación 1) mostró una elevada concentración de compuestos fenólicos totales (1320  $\mu\text{g/g}$ ), calculada como la suma de las concentraciones de los compuestos fenólicos individuales detectados. Esta concentración fue superior a la observada en condiciones de pH próximos a la neutralidad (921  $\mu\text{g/g}$ , publicación 2) debido, sin duda, a la mayor solubilidad de los compuestos fenólicos a pH alcalinos, como se ha demostrado en investigaciones previas llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación (Limón y col., 2015). Las concentraciones de compuestos fenólicos

encontradas en las fracciones solubles de lenteja en ambas condiciones se encuentran en el rango observado recientemente en diferentes variedades de lenteja (Bubelová y col., 2018). Los flavonoles constituyeron el principal grupo de compuestos fenólicos en la fracción soluble de harina de lenteja (control) en condiciones alcalinas (publicación 1) o próximas a la neutralidad (publicación 2), representando el 76% y más del 90% del total de compuestos fenólicos, respectivamente. Los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos también estuvieron presentes en la fracción soluble de lenteja, representando el 9% y 6% del total de compuestos fenólicos en condiciones alcalinas o ligeramente ácidas, respectivamente. Esta composición fenólica es similar a la encontrada previamente en diferentes cultivares de lentejas (López y col., 2017; Zhang, y col., 2015, 2017a), donde los glucósidos de kenferol se identificaron como los principales compuestos fenólicos extraíbles, mientras que los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos se encontraron en concentraciones muy inferiores.

Tras el procesado se observaron diferencias cualitativas y cuantitativas en la fracción fenólica de la lenteja. El contenido de compuestos fenólicos totales disminuyó significativamente en la lenteja procesada tanto en condiciones de pH próximas a la neutralidad (31%-65% de reducción) como ligeramente alcalinas (31-35% de reducción), independientemente del proceso empleado. Esta disminución del contenido fenólico puede atribuirse, principalmente, al descenso de la concentración de flavan-3-oles. Diversos estudios han puesto de manifiesto que la estabilidad de los monómeros y dímeros de flavan-3-oles depende del pH, de modo que son muy inestables en soluciones con pHs superiores a 6, disminuyendo su contenido en más de un 70% en pocas horas a estos pHs (Albuquerque y col., 2017; Ho y col., 2017; Hur y col., 2014; Li, y col., 2012; Zhu y col., 2002). La pérdida de este grupo de compuestos fenólicos durante el procesado a pHs 6,8 y 8,5 explicaría, en parte, la reducción del contenido fenólico observada en la fracción soluble de harina de lenteja procesada mediante fermentación, hidrólisis con Savinasa o combinación de ambas. Es interesante señalar que el contenido de ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos disminuyó hasta niveles no detectables en la lenteja sometida al tratamiento HS en condiciones alcalinas (publicación 1). Estos resultados discrepan de los observados en un estudio previo, donde se encontró que la acción combinada de las actividades esterasa y proteasa que posee la enzima Savinasa incrementó la bioaccesibilidad (liberación) de compuestos fenólicos unidos a proteínas o polisacáridos en harina de judía pinta a pH alcalino (García-Mora y col., 2015b). Los diferentes resultados obtenidos en ambos estudios podrían ser debidos a los menores tiempos de hidrólisis y pH empleados en la publicación de judía pinta (5h y pH 8 frente a las 15 h y pH 8,5 empleados en esta Tesis Doctoral) y, por tanto, a una menor degradación de ácidos

fenólicos a pH alcalino en la harina de judía. En condiciones de pH próximas a la neutralidad (pH 6,8), también se observó una reducción de los compuestos fenólicos, hecho atribuible, muy posiblemente, a que a este valor de pH no se alcanza la actividad máxima de la enzima Savinasa. Es interesante señalar que, a pesar de observarse una reducción del contenido total de compuestos fenólicos tras el procesado de lenteja, los procesos FLP y FLPS causaron un aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) de algunos compuestos fenólicos individuales. En este sentido, ambos procesos desarrollados a pH alcalino (publicación 1) causaron un aumento del contenido de los ácidos *p*-hidroxibenzoico y vanílico, y de algunos flavonoles (isoramnetina glucurónido y kenferol dirutinósido) en el caso del proceso FLP. En condiciones de neutralidad (publicación 2) se observó, en cambio, un aumento de ácido *p*-hidroxibenzoico y del contenido de flavonoles. El aumento en la concentración de estos compuestos puede atribuirse, principalmente, a la producción de esterasas, carbohidrolasas y  $\beta$ -glucosidasas extracelulares por *L. plantarum* (Esteban-Torres y col., 2015; Muñoz y col., 2016), como se ha explicado anteriormente. Estos resultados coinciden con los observados por Kwaw y col. (2018), quienes encontraron un aumento del contenido de flavonoles tras la fermentación de zumo de mora con esta BAL. Los procesos FLP y FLPS en ambas condiciones de pH también causaron una reducción del contenido de ciertos ácidos hidroxicinámicos, como el ácido *p*-cumárico, debido a su descarboxilación o reducción por las enzimas descarboxilasas de ácidos fenólicos o reductasas producidas por *L. plantarum* a sus correspondientes derivados de fenol o vinilo (Filannino y col., 2018). Se apreció, así mismo, una reducción de las concentraciones de ciertos flavonoides como la catequina (solo en condiciones alcalinas) y sus derivados, que fueron metabolizados por *L. plantarum*. La degradación de estos compuestos a pH básico también contribuiría a la reducción de flavonoides encontrada en condiciones alcalinas, como se ha demostrado en estudios previos (Hur y col., 2014). La composición fenólica del ingrediente obtenido mediante el tratamiento combinado (FLPS) fue muy similar a la observada cuando se consigue únicamente mediante fermentación (FLP), resultados que sugieren que el metabolismo fermentativo de *L. plantarum* contribuyó en mayor medida al perfil fenólico del ingrediente de lenteja conseguido con el proceso combinado de fermentación e hidrólisis enzimática (FLPS).

### 5.1.2. Efecto del procesado (hidrólisis enzimática, fermentación ácido láctica o combinación de ambos procesos) en la actividad biológica de la fracción soluble de lenteja.

El segundo aspecto estudiado en esta Tesis Doctoral ha sido el efecto del proceso combinado de fermentación con *L. plantarum* e hidrólisis con Savinasa sobre las propiedades multifuncionales de la fracción soluble o ingrediente obtenido a partir de harina de lenteja. Para ello, se evaluaron aquellas actividades biológicas consideradas más relevantes para el control del SMet (actividades antioxidante e inhibidoras de la ECA,  $\alpha$ -glucosidasa y lipasa pancreática). Con el fin de dilucidar los mecanismos implicados en los cambios en las actividades biológicas atribuidas a esta fracción soluble, se comparó el efecto del tratamiento combinado FLPS con el de los procesos individuales FLP y HS.

Para ello, se comenzó con el estudio del efecto del procesado sobre la **actividad inhibidora de la ECA**. Esta enzima juega un papel esencial en la regulación de la presión arterial (Nishimura, 2017) por lo que su inhibición parece ser uno de los fenómenos que contribuyen al control de la hipertensión, factor de riesgo involucrado en el SMet. De hecho, se ha demostrado que la inhibición de esta enzima por compuestos bioactivos presentes en los alimentos constituye una estrategia eficaz para reducir la presión arterial *in vivo*, contribuyendo así a prevenir o retrasar el riesgo de hipertensión arterial y de enfermedades cardiovasculares (Lee y Hur, 2017). La fracción soluble de la harina de lenteja no procesada mostró una actividad inhibidora de la ECA del 81% únicamente en condiciones próximas a la neutralidad (pH 6,8, publicación 2), si bien no se observó inhibición de la actividad de esta enzima en condiciones alcalinas (pH 8,5, publicación 1). El procesado de harina de lenteja mediante los procesos FLP, HS y FLPS en ambas condiciones mejoró significativamente su potencial actividad antihipertensiva, encontrándose valores entre 61,5-85,4% y 93-95% en las fracciones obtenidas de lenteja procesada en condiciones alcalinas y neutras, respectivamente. Los valores de  $IC_{50}$  para esta enzima fueron significativamente ( $p \leq 0,05$ ) más bajos en la fracción soluble de lenteja sometida a los tres tratamientos mencionados que en la fracción soluble de la lenteja control, confirmándose la mayor actividad inhibidora de la ECA de la lenteja procesada. En condiciones alcalinas (publicación 1), el proceso FLPS proporcionó el valor más bajo de  $IC_{50}$  (0,14 mg/mL), seguido de HS (0,18 mg/mL) y, finalmente, FLP (0,29 mg/mL), resultados que sugieren que la combinación de los tratamientos de fermentación e hidrólisis enzimática FLPS a pH alcalino fue el proceso más efectivo para mejorar la potencial actividad antihipertensiva de los ingredientes de lenteja, y que la enzima Savinasa proporcionó la mayor contribución a esta actividad (publicación 1). Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo han puesto de manifiesto que la Savinasa es una enzima efectiva en la

liberación de péptidos a partir de proteínas de lenteja a pH alcalino (pH 8,0) (García-Mora y col., 2014). Esta eficacia proteolítica puede atribuirse a su especificidad por residuos aromáticos e hidrofóbicos en posición P1 (García-Mora y col., 2017). *L. plantarum* podría haber contribuido también a la actividad inhibidora de la ECA observada en la lenteja sometida al tratamiento combinado FLPS, a juzgar por el valor de IC<sub>50</sub> de la muestra FLP, posiblemente a través de la generación de péptidos inhibidores de la ECA, como se ha demostrado anteriormente en diversas legumbres fermentadas (Jakubczyk y col., 2017; Singh y Vij, 2017; Torino y col., 2013). En condiciones neutras, en cambio, la lenteja sometida a los tratamientos FLP y FLPS mostró valores de IC<sub>50</sub> similares (0,38 y 0,39 mg/mL, respectivamente) y significativamente ( $p \leq 0,05$ ) inferiores a la hidrolizada HS (0,47 mg/mL), sugiriendo que *L. plantarum* fue el principal responsable de la actividad inhibidora de la ECA en estas condiciones (publicación 2). El aumento de los niveles de flavonoles y ácido *p*-hidroxibenzoico tras la fermentación con *L. plantarum*, así como la producción de péptidos bioactivos por esta bacteria (Jakubczyk y col., 2013, 2017), podrían explicar parcialmente al aumento de la actividad antihipertensiva *in vitro* observada en la lenteja sometida a FLPS. En este sentido, estudios previos han sugerido que los péptidos bioactivos y los compuestos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos y flavonoides, son los principales responsables de la actividad inhibidora de la ECA de la lenteja procesada (García-Mora y col., 2017; Mamilla y Mishra, 2017). La producción de péptidos con actividad inhibidora de la ECA por la enzima Savinasa también podría contribuir a la potencial actividad antihipertensiva del ingrediente de la lenteja obtenido por el proceso combinado FLPS a pH 6,8, si bien cabe esperar una menor contribución de esta enzima que en condiciones alcalinas, ya que el pH empleado ha sido inferior al óptimo de la enzima. Esta hipótesis se sustenta si se observa el menor valor de IC<sub>50</sub> en la fracción soluble de la lenteja obtenida por FLPS en condiciones alcalinas (IC<sub>50</sub>=0,18 mg/mL) en comparación con el obtenido en condiciones próximas a la neutralidad (IC<sub>50</sub>=0,47 mg/mL). Hay que señalar, además, que la mayor contribución de *L. plantarum* a la actividad inhibidora de la ECA observada en la lenteja sometida a FLPS en condiciones de pH neutro en comparación con las condiciones alcalinas se debe, sin duda, a la mayor velocidad de crecimiento de esta bacteria a pHs ácidos o neutros que a pHs alcalinos.

En esta fase I se evaluó, también, la **actividad inhibidora de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales** en la fracción soluble de harina de lenteja procesada. Las  $\alpha$ -glucosidasas son enzimas presentes en el intestino delgado implicadas en la degradación de los oligosacáridos y disacáridos a azúcares simples, liberando glucosa que es captada por los enterocitos (Simsek y col., 2017). Existen dos enzimas diferentes: los complejos maltasa-glucoamilasa (MGAM) y

sacarasa-isomaltasa (SI), ambas constituidas por dos subunidades catalíticas situadas en los extremos C- y N-terminal, que presentan diferente especificidad de sustrato (Gericke y col., 2017). El complejo catalítico MGAM tiene actividad  $\alpha$ -1,4-glucosidasa y participa en la digestión de maltosa y maltooligosacáridos, mientras que el complejo catalítico SI tiene actividades  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,4- y  $\alpha$ -1,6-glucosidasa, pudiendo hidrolizar sacarosa, maltosa, isomaltosa y maltooligosacáridos (Amiri y Naim, 2017). La inhibición de estas enzimas puede tener múltiples implicaciones positivas para la salud relacionadas con el control de la respuesta glucémica postprandial, contribuyendo a reducir el riesgo de sufrir DMT2 y causando una reducción del apetito y, por tanto, de la ingesta de alimentos (Simsek y col., 2015). Por ello, la inhibición de estas enzimas supone una diana clave para la prevención del SMet.

Uno de los logros de esta Tesis Doctoral ha sido la evaluación del potencial inhibidor selectivo del ingrediente de lenteja desarrollado sobre ambas actividades, sacarasa y maltasa, empleando sacarosa y maltosa como sustratos, a diferencia de la mayoría de estudios realizados hasta el momento donde solo se emplea uno de ellos. Los resultados obtenidos mostraron que la fracción soluble de lenteja control (1 mg/mL) inhibió fuertemente la actividad sacarasa (81%) y en menor medida la maltasa (30%) en condiciones alcalinas (publicación 1), si bien a pH neutro (publicación 2) solo se observó inhibición de la actividad sacarasa (75%). Curiosamente, en líneas generales tanto en el procesado en condiciones básicas como próximas a la neutralidad, la fracción soluble inhibió con mayor potencia la actividad sacarasa que la maltasa, lo que sugiere un modo de inhibición selectivo de esta fracción. Los flavonoles y los glucósidos de quercetina y kenferol han sido descritos como inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas (Zhang y col., 2015). De hecho, los flavonoles son el principal grupo de compuestos fenólicos en la fracción soluble obtenida, lo que podría explicar su alta actividad inhibidora de estas enzimas. En concordancia con estos resultados, Simsek y col. (2015) indicaron que la (+)-catequina inhibe en mayor medida la actividad sacarasa que la maltasa. Este compuesto está presente en la fracción soluble de la lenteja, lo que explicaría la mayor actividad inhibidora sobre la sacarasa encontrada en esta fracción. Los tres tipos de procesado utilizados causaron una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) de la actividad inhibidora de la sacarasa, tanto en condiciones alcalinas como neutras (publicaciones 1 y 2). La disminución en los niveles de algunos compuestos fenólicos como (+)-catequina y ácido *p*-cumárico, que se han descrito como potentes inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales (Pradeep y Sreerama, 2018), podría explicar la reducción de la actividad sacarasa de los ingredientes FLP, HS y FLPS. Por el contrario, se observó un fuerte incremento de la actividad inhibidora de la maltasa en HS y FLPS desarrollados en condiciones alcalinas (publicación 1) y a todos los casos

en condiciones cercanas a la neutralidad (publicación 2). En ambas condiciones de pH, FLPS mostró el mayor potencial hipoglucémico, a juzgar por su capacidad inhibidora de ambas enzimas intestinales (sacarasa y maltasa), resultados que sugieren que tanto HS como FLP contribuyen a esta actividad. El aumento del contenido de flavonoles durante el procesado podría estar relacionado con la mayor actividad inhibidora de la maltasa, ya que otros autores han demostrado que los flavonoles son inhibidores específicos de esta enzima (Fontana-Pereira y col., 2011; Şöhretoğlu y col., 2018). La mayor liberación de péptidos observada en HS en comparación con FLP en ambas condiciones, como se ha explicado anteriormente, sugiere que algunos de los péptidos producidos por la Savinasa podrían ser parcialmente responsables del aumento de las propiedades hipoglucémicas de la lenteja sometida al tratamiento FLPS. Esta hipótesis está reforzada por otros estudios que muestran que diversos péptidos liberados tras la hidrólisis de proteínas de legumbres son capaces de inhibir las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales (Mojica y col., 2017). Sin embargo, no se puede descartar la contribución de ciertos péptidos liberados por la actividad metabólica de *L. plantarum*, ya que Jakubczyk y col. (2017) demostraron la liberación de péptidos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas en judía fermentada empleando esta BAL como cultivo iniciador. Observando los porcentajes de inhibición para ambas actividades  $\alpha$ -glucosidasas, se puede deducir que la enzima Savinasa contribuye a la actividad inhibidora de la maltasa de la fracción soluble de lenteja sometida al tratamiento combinado FLPS en condiciones alcalinas, siendo *L. plantarum* el principal responsable en condiciones de pH neutro. La enzima Savinasa fue la principal responsable de la actividad inhibidora de la sacarasa a pH neutro, mientras que *L. plantarum* lo fue a pH alcalino. Estos hallazgos indican que el tratamiento combinado de fermentación e hidrólisis enzimática es una estrategia prometedora para la obtención de ingredientes derivados de lenteja que puedan emplearse para prevenir la hiperglucemia, factor de riesgo del SMet.

La **inhibición de la lipasa pancreática** por compuestos de los alimentos es también una estrategia efectiva en el control del SMet, ya que permite controlar la hiperlipidemia y el aumento de peso a través del retraso de la digestión y absorción de lípidos (Finer y col., 2000). La inhibición de la actividad de la lipasa solo se encontró en la fracción soluble de la lenteja control y procesada en condiciones alcalinas (publicación 1). La fracción soluble de la lenteja control mostró una potente actividad inhibidora de esta enzima (90,5% de inhibición,  $IC_{50} < 2$  mg/mL). Este efecto se puede atribuir principalmente a los compuestos fenólicos presentes, siendo las agliconas y glucósidos de kenferol los inhibidores más potentes, seguidos de la quercetina aglicona y quercetina arabinósido (Zhang y col., 2015). El procesado de la lenteja causó una pérdida significativa de actividad inhibidora de la lipasa en la fracción soluble

( $p \leq 0,05$ ). Para intentar explicar si estos polifenoles estaban implicados en dicha actividad, se realizó un análisis de correlación entre el contenido total de kenferol (agliconas y glucósidos) y la actividad inhibidora de la lipasa pancreática y se observó una fuerte asociación positiva ( $r = 0,998$ ,  $p \leq 0,05$ ). Estos resultados sugieren que la disminución de la actividad inhibidora de la lipasa en el ingrediente de lenteja obtenido a pH alcalino puede deberse a la degradación de kenferol durante los procesos FLP, HS y FLPS. La actividad inhibidora de lipasa aumentó con el tratamiento de lenteja de la siguiente manera:  $HS < FLPS < FLP$ , lo que sugiere que después de la fermentación con *L. plantarum* se obtiene una menor pérdida de la actividad inhibidora de la lipasa pancreática en la fracción soluble de lenteja.

Existen numerosas evidencias científicas que indican que el estrés oxidativo, un estado definido por niveles elevados de ERO, juega un papel clave en el desarrollo del SMet (Elnakish y col., 2013). Por este motivo, en esta primera fase de la presente Tesis Doctoral se evaluó la **actividad antioxidante** de las fracciones solubles obtenidas a partir de la lenteja procesada mediante dos ensayos diferentes: el ensayo de la capacidad atrapadora de radicales de oxígeno (ORAC) y la inhibición de la generación de ERO intracelulares en cultivos de macrófagos RAW 264.7. El ensayo ORAC determina la capacidad de inhibición frente a la oxidación inducida por radicales peroxilo. Como el radical peroxilo es el radical iniciador predominante de las reacciones de oxidación en los alimentos, los valores ORAC se pueden considerar como un indicador relevante de la actividad antioxidante de los alimentos (Xu y col., 2018). Los valores de ORAC de la fracción soluble de la lenteja control en condiciones alcalinas y neutras fueron muy similares (303 y 309 mM TE/g, respectivamente) y se encontraron dentro del rango de los obtenidos por otros autores en diversas legumbres (García-Mora y col., 2015b; Padhi y Ramdath., 2017; Singh y Vij, 2017; Zhang y col., 2015). La presencia de (+)-catequina, ácido trans *p*-cumárico, glucósidos de flavonoles o flavonas, que se han sugerido como los principales responsables de la actividad antioxidante de las legumbres (Oomah y col., 2011; Zhang y col., 2015), podrían estar contribuyendo a los altos valores de ORAC observados en la fracción soluble de lenteja. Sin embargo, la baja correlación encontrada entre el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides con los valores de ORAC en lenteja por otros autores (Zhang y col., 2015) sugieren que estos compuestos no son los únicos antioxidantes presentes en esta legumbre. Los procesos HS y FLPS causaron un incremento significativo de la actividad antioxidante de la fracción soluble de lenteja, mientras que el proceso FLP causó una disminución significativa de la misma con respecto a la lenteja control, en las dos condiciones estudiadas. Estos resultados indican que la enzima Savinasa contribuye en mayor medida que *L. plantarum* a la actividad antioxidante determinada por el método ORAC en el ingrediente

FLPS de la lenteja obtenido tanto a pH neutro como alcalino. Estudios previos han puesto de manifiesto que la hidrólisis de proteínas de lenteja con Savinasa libera péptidos de bajo peso molecular con actividad antioxidante debido a su capacidad donadora de átomos de hidrógeno (García-Mora y col., 2014, 2015a). De modo similar, se ha descrito que la fermentación con *L. plantarum* causa un incremento de la actividad antioxidante de diferentes legumbres, posiblemente debido a la bioconversión de compuestos fenólicos a formas más activas o a la producción de péptidos bioactivos por parte de esta bacteria (Limon y col., 2015; Starzyńska-Janiszewska y col., 2014; Torino y col., 2013). Sin embargo, los diferentes tiempos de fermentación y pH utilizados en la presente Tesis podrían explicar la reducción de la capacidad antioxidante del ingrediente FLP. La mayor actividad antioxidante observada en la fracción soluble de lenteja sometida al proceso combinado en comparación con los dos procesos individuales indica que tanto HS como FLP actúan de manera sinérgica mejorando notablemente los valores de ORAC de la fracción soluble de lenteja procesada, ya sea a pH alcalino (publicación 1) o pH neutro (publicación 2).

A continuación, se evaluó el potencial efecto citoprotector de la fracción soluble de lenteja procesada en condiciones de estrés oxidativo, empleando un modelo celular de macrófagos murinos RAW 264.7 inducido por un compuesto pro-oxidante potente, como es el *t*-BHP (Lv y col., 2017). Este compuesto induce daño celular debido, principalmente, a que causa una sobreproducción de ERO que reduce la viabilidad celular e induce su apoptosis. Inicialmente, se ensayaron diferentes concentraciones de *t*-BHP para asegurar la inducción de toxicidad por estrés oxidativo en las células. Los resultados indicaron que concentraciones superiores a 2,5 mM provocan un daño celular significativo y una tasa de muerte celular por encima del 50%. Se observó que la fracción soluble de lenteja era capaz de inhibir de modo significativo ( $p \leq 0,05$ ) la sobreproducción de ERO inducida por *t*-BHP únicamente a pH alcalino (~18% inhibición, publicación 1), mientras que a pH neutro no se detectó inhibición (publicación 2). Estos hallazgos sugieren que los compuestos bioactivos con actividad inhibidora del estrés oxidativo son más solubles y activos a pH alcalino que a pH neutro. Estas observaciones conseguidas a pH alcalino coinciden con los hallazgos publicados por Xuan y col. (2013), quienes observaron que extractos de lenteja (no se indica el pH de los extractos en el estudio) atenuaban la hipertrofia de cardiomiocitos inducida por angiotensina II mediante la disminución de los niveles de ERO. Estos autores explicaron el efecto citoprotector de los extractos de lenteja frente al estrés oxidativo inducido por angiotensina II por la presencia de compuestos fenólicos a los que atribuyen una doble acción: mediante la captación de ERO e inducción de la activación del sistema de defensa antioxidante celular. El mayor contenido de

compuestos fenólicos observado en la fracción soluble de lenteja a pH 8,5 (1.320 µg/g) que a pH 6,8 (921 µg/g) explicaría la diferente actividad antioxidante de ambas fracciones observada en macrófagos RAW 264.7. Además, los resultados obtenidos a pH neutro indican que los valores de actividad antioxidante determinada por métodos químicos, como el ORAC, y en cultivos celulares no siempre están completamente correlacionados entre sí. El procesado de la lenteja causó un aumento de su efecto citoprotector frente al estrés oxidativo, independientemente del método de procesado empleado y del pH de la fracción soluble. El mayor potencial protector celular se observó para la fracción de lenteja FLP a pH alcalino, seguida de HS y FLPS, si bien entre estas dos fracciones no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (publicación 1). En el caso del estudio realizado a pH neutro, los tratamientos HS y FLPS aumentaron en mayor medida la capacidad inhibidora de la generación de ERO de la fracción soluble de lenteja que el tratamiento FLP, resultados similares a los observados por el método ORAC. Nuevamente, se pudo corroborar que el pH al que se obtenga la fracción soluble afecta significativamente a su actividad biológica. A pesar de que el procesado de lenteja en ambas condiciones causó una disminución del contenido de compuestos fenólicos, tal y como se ha comentado anteriormente, esta disminución no conlleva una reducción del potencial citoprotector de la lenteja frente al estrés oxidativo. Esto, unido al hecho de que las fracciones solubles de lenteja FLP y FLPS obtenidas a pH 6,8 presentan similar composición fenólica y muy diferente actividad inhibidora de la formación de ERO, sugiere que otros compuestos distintos a los compuestos fenólicos contribuyen a la actividad antioxidante de la lenteja procesada. Teniendo en cuenta el similar contenido de péptidos encontrado en la lenteja sometida a HS y FLPS, tanto a pH alcalino como neutro, y que datos existentes en la literatura indican que tanto *L. plantarum* como la enzima Savinasa son capaces de liberar péptidos con capacidad de atrapar ERO a partir de proteínas de legumbre, se puede sugerir que son los péptidos formados durante el procesado de lenteja, fundamentalmente por la acción de la enzima Savinasa, pero también por las enzimas bacterianas, los responsables del aumento del potencial inhibidor de la formación de ERO de la fracción soluble de lenteja procesada utilizando los tres procesos tecnológicos estudiados. En el caso del estudio realizado a pH alcalino (publicación 1), no se puede descartar la implicación de otros metabolitos microbianos o compuestos formados por reacciones de condensación u oxidación en la actividad biológica mencionada (Filannino y col., 2018; Hur y col., 2014), habida cuenta de la mayor actividad inhibidora de la producción de ERO observada tras el proceso FLP a este pH en comparación con el resto de los procesos.

### 5.1.3. Caracterización de los compuestos bioactivos de la fracción soluble de lenteja obtenida mediante tratamiento combinado de fermentación e hidrólisis enzimática (FLPS).

Con el fin de identificar y caracterizar los compuestos bioactivos liberados durante el proceso combinado FLPS desarrollado en las dos condiciones de pH estudiadas, que demostró ser más efectivo que FLP y HS aplicados separadamente, se realizó un sub-fraccionamiento de la fracción soluble de lenteja mediante cromatografía de exclusión molecular empleándose columnas MidiTrap de Sephadex G-10. Se obtuvieron 5 subfracciones (F1-F5), en las que se cuantificó el contenido de péptidos y compuestos fenólicos totales y pormenorizados, y se determinaron las actividades biológicas (inhibidoras de la ECA, de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales y de la lipasa pancreática, así como la actividad antioxidante) que, como se ha indicado anteriormente, se consideraron las más relevantes para el control del SMet. Todas las subfracciones mostraron actividad en todos los ensayos biológicos realizados, con la excepción de F3, F4 y F5 que no mostraron actividad inhibidora de la lipasa pancreática cuando la fracción soluble de lenteja se obtuvo a pH 8,5 (publicación 1), y tampoco las correspondientes subfracciones F3, F4 y F5 obtenidas a pH 6,8, que no mostraron actividad inhibidora de la ECA (publicación 2). Comparando los datos de bioactividad, destacaron **dos subfracciones obtenida a pH alcalino**: F1 y F5 (publicación 1). La **subfracción F1**, constituida por un 56% de péptidos y un 5% de compuestos fenólicos, presentó las actividades inhibidoras de la ECA y de la lipasa pancreática más altas, así como un mayor potencial antioxidante determinado como inhibición de la generación de ERO inducida por *t*-BHP en macrófagos RAW 264.7. Además, esta subfracción presentó una elevada actividad inhibidora de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales (tanto actividad maltasa como sacarasa), así como actividad antioxidante (determinada por ORAC). La **subfracción F5**, compuesta por un 91% de péptidos y 10% de compuestos fenólicos, mostró una mayor actividad en el ensayo ORAC e inhibidora de la actividad maltasa. Por el contrario, esta subfracción mostró una baja inhibición de la generación de ERO en macrófagos RAW 264.7 inducida por *t*-BHP y no exhibió actividad inhibidora de la lipasa pancreática. Entre las **subfracciones obtenidas a pH neutro** (publicación 2), destacó la **subfracción F1** por ser la que presentaba mayor contenido de péptidos y compuestos fenólicos, así como valores de ORAC superiores a las demás subfracciones. Por este motivo, se seleccionaron las subfracciones F1 obtenidas a partir de lenteja procesada por FLPS en ambas condiciones de pH y se caracterizó pormenorizadamente su fracción fenólica y peptídica mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem (HPLC-MS/MS), con el fin de relacionar la composición de estas subfracciones, consideradas las más activas, con la multifuncionalidad observada.

En la subfracción F1 obtenida mediante proceso FLPS en condiciones alcalinas se identificaron un total de 30 péptidos con pesos moleculares dentro del rango 1100-3200 Da, derivados de las proteínas convicilina, vicilina (alérgeno Len c 1.0101 y 1.0102) y lectina (publicación 1). En condiciones de pH neutro, en cambio, se identificaron únicamente 3 péptidos con pesos moleculares comprendidos entre 838 y 1225 Da, derivados de vicilina, convicilina y ADP-glucosa pirofosforilasa, enzima esta última implicada en la biosíntesis de almidón (publicación 2). La mayor liberación de péptidos a pH básico podría explicarse por la mayor actividad de la enzima Savinasa a este pH. Los péptidos identificados en ambas condiciones contenían secuencias aminoacídicas descritas como inhibidoras de la ECA o con actividad antioxidante. Además, tres de los péptidos encontrados en la subfracción F1 del ingrediente obtenido a pH alcalino (DLAIPVNNPGQLESF, LVNEGKGNLELVGF e ITPEKNPQLQDLDF) se han descrito previamente como péptidos con doble actividad antioxidante e inhibidora de la ECA (García-Mora y col., 2017).

Se realizó un estudio detallado estructura-actividad de los péptidos identificados en ambas condiciones con el fin de determinar, de manera teórica en base a los datos de la bibliografía, su potencial actividad biológica. Se ha descrito que la presencia de aminoácidos aromáticos (fenilalanina), hidrofóbicos (valina, leucina, glicina o prolina) o aminoácidos cargados positivamente (arginina e histidina) en el tripéptido situado en el extremo C-terminal es determinante para la unión de péptidos inhibidores a la ECA. Así mismo, la presencia de prolina, histidina o tirosina en la secuencia peptídica o bien de aminoácidos hidrofóbicos con cadenas alifáticas como glicina, isoleucina, leucina y valina en el extremo N-terminal de los péptidos se ha demostrado que contribuye notablemente a la actividad inhibidora de la ECA (Daskaya-Dikmen y col., 2017; Gu y Wu, 2013; Li y Li, 2013; Liu y col., 2018). Muchas de estas características estructurales estuvieron presentes en los péptidos identificados en la subfracción F1 de LF obtenida en ambas condiciones de pH.

Además, estudios recientes han aportado información interesante sobre las características estructurales de los péptidos antioxidantes, sugiriendo que la presencia de lisina, triptófano, cisteína o aminoácidos aromáticos (fenilalanina, histidina o tirosina) es crucial para la actividad captadora de radicales libres (Li y Li, 2013; Tian y col., 2015; Yang y col., 2017). La presencia de aminoácidos hidrofóbicos voluminosos en la región C-terminal o aminoácidos polares/cargados en la posición C1 también se ha relacionado con la actividad antioxidante de los péptidos determinada por el ensayo ORAC (Orsini Delgado y col., 2016). La existencia de aminoácidos hidrofóbicos con bajo punto isoeléctrico (alanina, glicina, valina y leucina) en la región N-terminal proporciona también una elevada actividad antioxidante a los

péptidos (Li y col., 2011). Los péptidos identificados en las subfracciones F1 presentaron algunas de estas características, lo que sugiere su potencial actividad antioxidante. Muchos de ellos son, además, potencialmente inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales, ya que presentan los atributos estructurales característicos de los péptidos con elevada actividad hipoglucémica identificados hasta el momento. En este sentido, se ha puesto de manifiesto que estos péptidos contienen al menos un aminoácido con una cadena lateral básica o con un grupo hidroxilo en el extremo N-terminal (serina, treonina o tirosina), prolina, lisina y arginina en cualquier posición de la secuencia aminoacídica y alanina, prolina o metionina en el extremo C-terminal (Ibrahim y col., 2018).

Estas características estructurales descritas en la bibliografía para los péptidos con actividad antioxidante o inhibitoras de la ECA y las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales sugieren, por tanto, la potencial actividad multifuncional de los péptidos presentes en las subfracciones F1 obtenidas a partir de la fracción soluble de lenteja sometida al tratamiento FLPS en condiciones de pH básicas o neutras.

Con respecto a la evaluación del perfil fenólico de las subfracciones F1, se observó que los flavonoides fueron los compuestos más abundantes, siendo el kenferol-rutinósido hexósido el compuesto mayoritario. Los flavonoides constituyeron la totalidad de los compuestos fenólicos identificados en la fracción F1 obtenida en condiciones alcalinas (publicación 1) y el 75% en la obtenida en condiciones a pH neutro (publicación 2). En este último caso, el 25% restante correspondió a derivados del ácido gálico. Los flavonoides son compuestos con reconocida actividad antioxidante, capaces de captar los principales radicales pro-oxidantes del organismo (Krishnan y col., 2018), y que ejercen esta acción a través de diversos mecanismos. Estudios previos han puesto de manifiesto que los flavonoides de la lenteja están implicados en la neutralización de radicales libres y en la unión a iones metálicos a través de la donación de hidrógeno o electrones, o un mecanismo mixto (Zhang y col., 2015). El kenferol ha demostrado ser un potente antioxidante a través de la activación de una de las rutas de señalización celular implicadas en la defensa frente al estrés oxidativo, como es la mediada por el factor de transcripción Nrf2 en tejidos pulmonares (Kumar y col., 2014). Así mismo, los glucósidos de kenferol y los dímeros de procianidina juegan un papel significativo en la actividad antioxidante total de extractos hidrofílicos obtenidos a partir de 20 cultivares diferentes de lenteja (Zhang y col., 2015). Además, las agliconas y glucósidos de kenferol presentes en legumbres han demostrado ser buenos inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas intestinales y lipasa pancreática (Tan y col., 2017; Zhang y col., 2015), al bloquear su centro catalítico e inducir cambios conformacionales que conducen a su inactivación (Peng y col.,

2016). Existen evidencias científicas que indican que los dímeros de prodelfinidina también pueden unirse al centro activo de la lipasa pancreática e inhibir su actividad (Buchholz y Melzig, 2015). Las procianidinas oligoméricas y el kenferol han demostrado, también, efectos inhibidores de la ECA (Afonso y col., 2013; Guerrero y col., 2012). Estos hallazgos obtenidos en estudios científicos previos refuerzan la hipótesis de que los compuestos fenólicos identificados en las subfracciones F1 estudiadas contribuyen de manera notable a la bioactividad encontrada en la fracción soluble de lenteja procesada mediante FLPS en ambas condiciones de pH.

#### **5.1.4. Efecto de la digestión gastrointestinal simulada en la bioaccesibilidad de péptidos y compuestos fenólicos y actividad biológica de la fracción soluble de lenteja obtenida mediante tratamiento combinado de fermentación e hidrólisis enzimática (FLPS).**

Durante la DGI se producen modificaciones químicas y bioquímicas en las estructuras de las proteínas y compuestos fenólicos y, como consecuencia, se promueve la liberación de nuevos compuestos bioactivos y/o la degradación de otros existentes. Estas modificaciones de los compuestos bioactivos presentes en los alimentos, por tanto, afecta a su bioaccesibilidad y bioactividad. Por este motivo, en la fase I de la presente Tesis Doctoral se evaluó también la influencia de la DGI *in vitro*, siguiendo el protocolo de digestión estática desarrollado por Minekus y col. (2014), sobre la composición y actividad biológica de la fracción soluble de la lenteja procesada mediante el tratamiento combinado de fermentación e hidrólisis enzimática con Savinasa –FLPS- en condiciones de pH ligeramente alcalinas (publicación 1) o próximas a la neutralidad (publicación 2). Se observó que el contenido de péptidos y compuestos fenólicos aumentó entre 2-3 veces y entre 5-6 veces, respectivamente, en ambas condiciones. Estos resultados sugieren la formación de nuevos péptidos por acción de las proteasas y peptidasas gastrointestinales, así como la liberación de compuestos fenólicos unidos a proteínas, favoreciendo su bioaccesibilidad, como se ha demostrado recientemente (Pellegrini y col., 2017).

La actividad inhibidora de la ECA de la fracción soluble de lenteja procesada (FLPS) a pH 8,5 disminuyó tras la digestión *in vitro*, a juzgar por el mayor valor de IC<sub>50</sub> observado tras la digestión (0,14 mg/mL frente a 0,23 mg/mL observado después de la digestión) (publicación 1). Este efecto había sido observado previamente en hidrolizados de lenteja obtenidos por hidrólisis enzimática con Savinasa en condiciones alcalinas tras el proceso de digestión simulada (García-Mora y col., 2015a). Esta disminución del potencial antihipertensivo puede atribuirse a la degradación de péptidos con actividad inhibidora de la ECA por las proteasas

gastrointestinales. Por el contrario, la fracción soluble de lenteja obtenida a pH 6,8 mostró un valor de IC<sub>50</sub> para la ECA significativamente ( $p \leq 0,05$ ) inferior (0,19 mg/mL) al observado previamente a la digestión (0,39 mg/mL), indicando un aumento de su potencial actividad antihipertensiva tras la DGI simulada. Estos resultados indican la liberación de nuevos péptidos con actividad inhibidora de la ECA, así como la liberación de compuestos fenólicos no extraíbles por acción de las enzimas proteolíticas gástricas e intestinales. Por tanto, el pH en el que se obtiene el ingrediente de lenteja mediante el proceso FLPS tiene un impacto clave en la actividad antihipertensiva de esta fracción tras la DGI.

Por lo que se refiere a las actividades inhibitoras de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales (tanto sacarasa como maltasa) y lipasa pancreática, disminuyeron tras el proceso de DGI simulada, tanto en condiciones alcalinas como neutras. Estos resultados se podrían atribuir a la degradación de compuestos fenólicos con actividad inhibidora de estas enzimas durante el proceso de digestión *in vitro*, debido al efecto del pH y de las enzimas digestivas, que producen modificaciones químicas y del peso molecular de los compuestos fenólicos, como se ha demostrado en estudios recientes (Burgos-Edwards y col., 2017; Luzardo-Ocampo y col., 2017; Orqueda y col., 2017). De modo similar, péptidos inhibidores de ambas enzimas liberados por la Savinasa durante el proceso FLPS podrían hidrolizarse durante la DGI *in vitro*, disminuyendo la actividad inhibidora de la fracción soluble de lenteja sobre estas enzimas.

Por otra parte, la DGI simulada no modificó significativamente ( $p > 0,05$ ) los valores de ORAC de la fracción soluble de lenteja FLPS obtenida en condiciones alcalinas, si bien se incrementó significativamente ( $p \leq 0,05$ ) la actividad inhibidora de la generación de ERO (publicación 1). En cambio, a pH neutro, los valores de ORAC de la fracción FLPS prácticamente se duplicaron (publicación 2). Estos resultados coinciden con hallazgos previos que demuestran que la DGI *in vitro* de hidrolizados obtenidos a partir de proteínas de lenteja con la enzima Savinasa libera fragmentos peptídicos con mayor actividad antioxidante que la observada en los péptidos precursores (García-Mora y col., 2014, 2015a, 2017). No se puede descartar, sin embargo, la posible contribución de compuestos fenólicos libres liberados por acción de las proteasas digestivas en el aumento de los valores de ORAC y del efecto protector frente a la sobreproducción de ERO en macrófagos sometidos a estrés oxidativo inducido por *t*-BHP de las fracciones solubles de lenteja estudiadas.

En conjunto, nuestros resultados indican que la digestión gastroduodenal induce cambios en la composición y bioactividad de la fracción soluble de lenteja procesada mediante FLPS, si bien estos cambios van a depender del pH y del tiempo del proceso.

## **5.2. FASE II: Optimización de los parámetros del proceso de fermentación en combinación con la hidrólisis enzimática a pH controlado para maximizar el contenido de compuestos bioactivos y el potencial multifuncional de la fracción soluble de lenteja (publicación 3).**

Una vez demostrado el efecto positivo del proceso combinado de fermentación con *L. plantarum* e hidrólisis enzimática con Savinasa a pH controlado en dos condiciones diferentes sobre las características multifuncionales de la fracción soluble de lenteja, la siguiente fase de la presente Tesis Doctoral consistió en realizar una optimización de las condiciones del proceso, con el fin de maximizar el contenido de compuestos bioactivos y actividades biológicas relevantes para la prevención y control del SMet. Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación demostraron que una temperatura de 37 °C y una velocidad de agitación en torno a 300-350 rpm eran las óptimas para favorecer el crecimiento de *L. plantarum* durante la fermentación en estado líquido de lenteja y judía pinta (Limón y col., 2015; Torino y col., 2013). Por este motivo, seleccionamos el tiempo y pH del proceso, que en los estudios realizados en la primera fase de esta Tesis Doctoral han demostrado tener gran influencia en la bioactividad de la lenteja, como variables a optimizar en el proceso FLPS (publicación 3).

La optimización se realizó mediante un diseño experimental empleando la metodología Superficie Respuesta (MSR), que ha demostrado ser una herramienta estadística muy útil para evaluar el efecto individual, así como la interacción de diversos factores en una o diversas variables respuesta, ahorrando tiempo y número de experimentos a realizar en comparación con la optimización de cada factor separadamente (Paucar-Menacho y col., 2017a,b). En la optimización se utilizó un modelo compuesto rotacional centrado en las caras para investigar el efecto de dos variables independientes (tiempo y pH) en 8 variables respuesta (variables dependientes): contenido de proteína, péptidos, compuestos fenólicos, actividad antioxidante, actividades inhibitoras de la ECA, de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales y lipasa pancreática y capacidad inhibitoria de la producción de ON en macrófagos RAW 264.7. Este diseño experimental también permitió seleccionar la combinación de ambos parámetros del proceso para minimizar el contenido en proteínas y maximizar el resto de variables respuesta empleando la función de deseabilidad (Derringer y Suich, 1980). En la optimización se emplearon tiempos y valores de pH en los rangos 5,5-30 h y 6,5-8,5, respectivamente, empleándose 5 niveles para cada variable, que dio lugar a 10 experimentos de fermentación combinada con hidrólisis enzimática (publicación 3).

Los resultados obtenidos indicaron que las diferentes combinaciones de tiempo y pH estudiadas influyeron significativamente en el contenido de compuestos bioactivos y en las

actividades biológicas (antihipertensiva, hipoglucémica, hipolipémica, antioxidante y anti-inflamatoria) de la fracción soluble de lenteja. En este sentido, el contenido de proteína, péptidos y compuestos fenólicos varió entre 246-814 mg /g, 163-379 mg /g y 40-75 mg GAE/g, respectivamente. También, se observaron variaciones en las actividades antioxidante (339-582 mM TE/g) e inhibidoras de la ECA (47-95 %), de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales (0-89 % inhibición), de la lipasa pancreática (36-57 % inhibición) y de la producción de ON en macrófagos inducida por LPS bacteriano (34-50 % inhibición), dependiendo de las condiciones del proceso. Resulta evidente, por tanto, que el pH y el tiempo de fermentación tienen un impacto clave en la composición y actividades biológicas de la fracción soluble de lenteja sometida al tratamiento combinado de fermentación e hidrólisis enzimática, confirmando los resultados obtenidos en la Fase I de esta Tesis Doctoral.

Con el fin de conocer el efecto del tiempo y pH del proceso sobre la composición y actividad biológica de la fracción soluble de lenteja obtenida, los datos experimentales se ajustaron a la siguiente ecuación polinómica de segundo grado:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \beta_{ij} X_i X_j$$

Donde Y es la variable respuesta,  $\beta_0$ ,  $\beta_i$  y  $\beta_{ii}$  representan los coeficientes del modelo, para los términos lineal, cuadrático e interacción entre variables, mientras que  $X_i$  y  $X_j$  representan las variables independientes (tiempo y pH).

Se realizó un análisis de la varianza para conocer qué términos de la ecuación tienen un efecto significativo sobre las variables respuesta y si las desviaciones de los datos experimentales a las ecuaciones teóricas podrían ser descritas por los modelos obtenidos. El valor de probabilidad para el estadístico F indicó qué ecuaciones polinómicas obtenidas resultaron ser adecuadas para explicar la variabilidad de los datos experimentales, con excepción del modelo obtenido para la actividad antiinflamatoria ( $p > 0,05$ ), que no fue significativo.

También se evaluó la bondad de ajuste de los datos experimentales a las ecuaciones polinómicas mediante el cálculo de los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), que estuvieron comprendidos entre 0,85 y 0,96, indicando que al menos el 85% de los datos experimentales se ajustan a los modelos obtenidos. La única excepción fue, nuevamente, el modelo teórico obtenido para la actividad antiinflamatoria, que no se ajustó a los datos experimentales. Las gráficas tridimensionales resultado de los modelos experimentales, representando el efecto de ambas variables independientes sobre las diferentes variables respuesta, permitieron evaluar

más detalladamente la influencia del tiempo y pH sobre los compuestos bioactivos y actividad biológica de la fracción soluble de lenteja fermentada con *L. plantarum* en combinación de Savinasa (publicación 3).

Los resultados indicaron que tanto los términos lineales como los cuadráticos y la interacción entre tiempo y pH afectaron de manera significativa al contenido de proteína soluble de lenteja obtenida por el tratamiento FLPS. El gráfico tridimensional de superficie de respuesta ilustró que el contenido proteico se reduce al aumentar el tiempo del proceso, resultado que se atribuyó a la proteólisis y generación de péptidos y aminoácidos libres por la acción de la enzima Savinasa (García-Mora y col., 2014) y al sistema proteolítico de *L. plantarum* (De Angelis y col., 2016). Por el contrario, el contenido de proteína soluble se incrementó al aumentar los valores de pH debido, sin duda, al aumento de la solubilidad de las proteínas de lenteja a pHs comprendidos en el rango 8-12 (Limón y col., 2014).

El pH del proceso fue el factor que ejerció mayor influencia en el contenido de péptidos de la fracción soluble de lenteja, mostrando tanto el término lineal como el cuadrático un efecto positivo. El tiempo, en cambio, mostró un efecto cuadrático negativo. Estos resultados sugieren una mayor actividad proteolítica de los ingredientes de lenteja obtenidos a pHs alcalinos, resultados que son consistentes con la actividad proteolítica óptima a pH 8 de la enzima Savinasa (García-Mora y col., 2014, 2015b). Como consecuencia, el contenido de péptidos aumentó con el tiempo de hidrólisis hasta alcanzar un máximo a las 21 h, y a partir de ahí se observó una disminución. La actividad proteolítica en las diferentes condiciones ensayadas se confirmó, posteriormente, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico. El perfil electroforético de la harina de lenteja no fermentada fue similar al observado previamente (García-Mora y col., 2014), indicando la presencia de 9 bandas proteicas predominantes con pesos moleculares en el rango 14-90 kDa, correspondientes a diversas isoformas de la lipoxigenasa y a las subunidades de las globulinas 7S y 11S. La fermentación con *L. plantarum* a pH controlado en presencia de Savinasa causó, en general, una extensa proteólisis, que se reflejó en la desaparición o pérdida de intensidad de las bandas proteicas principales, junto con la aparición de fragmentos proteicos de bajo peso molecular (3,5-15 kDa). La hidrólisis proteica aumentó con el tiempo de fermentación, independientemente del pH empleado. No obstante, el pH también afectó a la eficacia proteolítica de las enzimas durante el proceso, de modo que a pHs alcalinos (~8) se observó una degradación proteica más rápida y una mayor liberación de péptidos de bajo peso molecular en comparación a fermentación realizada a pHs cercanos a la neutralidad. Estos

resultados confirman la mayor eficiencia proteolítica en el proceso de fermentación combinada con hidrólisis enzimática cuando éste se realiza a pHs alcalinos.

El contenido de compuestos fenólicos totales se vio afectado positivamente por los efectos lineales y cuadráticos del pH, de manera que pHs más altos causaron un aumento del contenido fenólico, al igual que observamos para el contenido peptídico. El aumento de compuestos fenólicos en la fracción soluble a pH alcalinos puede atribuirse a la liberación, mediada o no por enzimas, de compuestos fenólicos unidos a proteínas o polisacáridos de la pared celular (Chandrasekara y Shahidi, 2010). Trabajos previos han demostrado que la solubilidad de los compuestos fenólicos es dependiente del pH, siendo más alta a pHs en el rango 8-12 (Limón y col., 2014). Las condiciones alcalinas favorecen la hidrólisis de los enlaces de unión entre compuestos fenólicos y polisacáridos de la pared celular (Acosta-Estrada y col., 2014). Por otro lado, *L. plantarum* produce carbohidrolasas,  $\beta$ -glucosidasas y una amplia gama de esterasas que son altamente específicas y eficaces en la liberación de compuestos fenólicos que están entrecruzados con las celulosas y hemicelulosas que forman parte de la pared celular, ligadas a glucósidos o esterificados con arabinoxilanos y pectina, respectivamente (Esteban-Torres y col., 2016). La actividad de estas enzimas es similar en condiciones neutras y alcalinas suaves (Esteban-Torres y col., 2015; Sestelo y col., 2004). Además, la enzima Savinasa ha demostrado tener actividad esterasa a pH 8 (García-Mora y col., 2015b), por lo que podría contribuir al aumento del contenido de compuestos fenólicos solubles del ingrediente obtenido en condiciones alcalinas suaves.

Con respecto a la actividad biológica de los ingredientes de lenteja obtenidos mediante FLPS, se observó que el pH fue el factor con mayor influencia en la actividad antioxidante, presentando efectos tanto lineales como cuadráticos positivos. El tiempo, en cambio, mostró una influencia de tipo cuadrático negativa. Así, la actividad antioxidante disminuyó entre los pHs 6,5 y 7,5, a partir del cual aumentó gradualmente hasta alcanzar un valor máximo a pH 8,5. El tiempo no presentó efectos lineales significativos, en contraposición con resultados previos que mostraron que la actividad antioxidante de hidrolizados de caseína aumenta con el tiempo de hidrólisis (Nongonierma y col., 2017). El aumento de la actividad antioxidante de la fracción soluble de la lenteja obtenida en condiciones alcalinas podría atribuirse al mayor contenido de compuestos fenólicos y péptidos. La proteólisis de lentejas por la enzima Savinasa a pH 8,5 produce péptidos con capacidad de atrapar radicales peroxilo (García-Mora y col., 2017). Además, el pH alcalino favorece la liberación no enzimática de compuestos fenólicos unidos a componentes de la pared celular, fenómeno que está relacionado con el aumento del contenido en compuestos fenólicos solubles y actividad antioxidante en esta

fracción. Un estudio reciente llevado a cabo en una mezcla compuesta por hidrolizados de proteínas de suero lácteo, ácido gálico y epigallocatequina ha puesto de manifiesto que los péptidos y compuestos fenólicos pueden presentar efectos antioxidantes sinérgicos (Cao y Xiong, 2017). Por otra parte, el pH podría influir en la actividad antioxidante debido a que causa una modificación de la estructura de los compuestos fenólicos. Las catequinas, uno de los compuestos fenólicos predominantes en esta legumbre, aumentan su capacidad de donación de electrones tras la desprotonación que tiene lugar a pH elevados (Muzolf y col., 2008).

De modo similar al observado para la actividad antioxidante, el tiempo de fermentación tuvo una influencia cuadrática negativa sobre la actividad inhibidora de la ECA. Esta actividad aumentó en la fracción soluble de lenteja hasta un tiempo de 16 h, disminuyendo posteriormente. Los péptidos y compuestos fenólicos han sido considerados en la bibliografía como los principales responsables de la actividad inhibidora de la ECA en lenteja (García-Mora y col., 2017; Mamilla y Mishra, 2017). Nuestros resultados están de acuerdo con un estudio previo que puso de manifiesto que tiempos de hidrólisis largos causan la degradación de péptidos inhibidores de la ECA en hidrolizados de lenteja (García-Mora y col., 2014). El pH, por el contrario, tuvo un efecto positivo en el potencial antihipertensivo de este ingrediente, que alcanzó un valor máximo a pH 8,5. Estos resultados podrían ser debidos a la mayor proteólisis a pHs alcalinos, responsable de la formación de péptidos antihipertensivos y de la liberación de compuestos fenólicos unidos.

La fracción soluble de la lenteja procesada mostró una enorme variación en la inhibición de la actividad sacarasa en función de las condiciones observándose valores de inhibición comprendidos entre un 0% y un 89%. Los datos experimentales no se ajustaron al modelo de regresión, como se ha comentado anteriormente, por lo que las diferencias observadas en esta actividad biológica para las diferentes condiciones estudiadas no se deben exclusivamente al efecto del tiempo y la temperatura. Es necesario realizar un estudio, por tanto, de otros parámetros adicionales como la temperatura, relación enzima/harina y cantidad de inóculo de cultivo iniciador que podrían influir significativamente en las actividades inhibidoras de las  $\alpha$ -glucosidasas. Zhang y col. (2015) evaluaron la actividad inhibidora de la  $\alpha$ -glucosidasa de extractos fenólicos obtenidos a partir de 20 cultivares canadienses de lenteja. Los resultados de este estudio demostraron que solo los flavonoles fueron capaces de inhibir las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales. En base al estudio de Zhang y col. (2015), se puede inferir que las diferencias observadas en la actividad inhibidora de las  $\alpha$ -

glucosidasas de las fracciones solubles obtenidas en las distintas condiciones estudiadas se deben a variaciones en el contenido de flavonoles.

Tanto el pH como la duración del proceso tuvieron un efecto lineal y cuadrático significativo sobre la actividad inhibidora de la lipasa pancreática, al igual que la interacción entre ambos factores. El término lineal del pH ejerció la mayor influencia sobre esta actividad, siendo su efecto negativo. De forma similar, la interacción entre ambos parámetros tuvo un impacto negativo sobre la inhibición de la lipasa pancreática. Por el contrario, los términos lineal y cuadrático del tiempo y el término cuadrático de pH mostraron un efecto positivo sobre la inhibición de esta enzima. Estudios previos han puesto de manifiesto los efectos inhibidores sobre la lipasa pancreática de extractos ricos en compuestos fenólicos (Buchholz y Melzig, 2015). En particular, la inhibición de esta enzima por la fracción soluble de la lenteja se ha asociado a la presencia de flavonoles, especialmente agliconas y glucósidos de kenferol y quercetina (Zhang y col., 2015). Teniendo en cuenta que los flavonoles son inestables a pHs neutros y alcalinos (Li y col., 2016), es coherente que el modelo de regresión indique que se alcanza la máxima actividad inhibidora de la lipasa pancreática (80%) a tiempos de fermentación largos (>30 h) y valores de pH más bajos (6,4).

Considerando que el SMet se caracteriza por un grado de inflamación crónica y, por tanto, por un aumento de la concentración de marcadores de inflamación en la circulación sistémica (Martínez-Larrad y col., 2016), se consideró interesante evaluar la actividad antiinflamatoria de la fracción soluble de la lenteja o ingrediente obtenido en las distintas condiciones estudiadas. Debido a que el ON es un mediador implicado en múltiples rutas inflamatorias, la inhibición de su producción en macrófagos por compuestos bioactivos presentes en los alimentos es una indicación clara de la actividad antiinflamatoria de dichos alimentos (Sharma y col., 2007). El tratamiento de cultivos de macrófagos RAW 264.7 con el ingrediente lenteja obtenido en las distintas condiciones a una concentración de 0,5 mg/mL no afectó a la viabilidad de dichas células y disminuyó significativamente ( $p \leq 0,05$ ) la secreción de ON (~33-50%) por los macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS bacteriano, en comparación con las células control. Se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en el potencial antiinflamatorio dependiendo de las diferentes condiciones de pH y tiempo. Cabe señalar que la máxima actividad antiinflamatoria se alcanzó tras el proceso llevado a cabo a pH 6,5 durante 15 h. Teniendo en cuenta que el modelo de regresión para la actividad antiinflamatoria obtenido no fue estadísticamente significativo, no fue posible establecer una asociación entre los factores pH y tiempo y la actividad antiinflamatoria observada. Por tanto, al igual que se ha sugerido para el caso de la actividad inhibidora de las  $\alpha$ -glucosidasas, es necesario estudiar la

influencia de parámetros adicionales para explicar las variaciones en la actividad antiinflamatoria de la fracción soluble de lenteja obtenida en las diferentes condiciones estudiadas. Diversas evidencias científicas muestran que los flavonoles (kenferol, quercetina y sus derivados) son los compuestos antiinflamatorios más potentes en extractos solubles de lenteja. Los flavonoides inhiben la expresión *in vivo* de ARNm de citoquinas pro-inflamatorias incluyendo TNF- $\alpha$ , IL6 e IL1 $\beta$  (Zhang y col., 2017a) y dificultan la producción de ON en macrófagos RAW 264.7 inducida por LPS, disminuyendo así la respuesta inflamatoria (Devi y col., 2015). En base a los datos de la bibliografía, se puede deducir que la mayor actividad antiinflamatoria encontrada en la fracción soluble de lenteja a pH 6,5 durante 15 h (50% de inhibición) está relacionada con la mayor estabilidad de los flavonoles en estas condiciones de fermentación (Li y col., 2016). Estudios previos han atribuido la actividad antiinflamatoria de los hidrolizados proteicos a péptidos bioactivos específicos (López-Barrios y col., 2016). Sin embargo, no se han identificado hasta el momento péptidos antiinflamatorios derivados de proteínas de lenteja.

Una vez estudiada la influencia de las condiciones de fermentación combinada con hidrólisis enzimática (tiempo y pH) sobre el contenido de péptidos y compuestos bioactivos y actividad biológica de las fracciones solubles de lenteja obtenidas, se aplicó la función de deseabilidad con el fin de identificar las condiciones óptimas que dan lugar a los valores deseables para todas las variables respuesta estudiadas. Se establecieron como criterios de deseabilidad el menor contenido de proteína soluble, el contenido más elevado de péptidos y compuestos fenólicos, así como mayores actividades antioxidante e inhibidoras de la ECA y de la lipasa pancreática. Basándose en este criterio, la función de deseabilidad indicó que pH 8,5 y tiempo de 11,63 h eran las condiciones de fermentación óptimas globales, con un valor de deseabilidad de 0,66. En estas condiciones, el modelo de superficie de respuesta predijo contenidos de proteína, péptidos y compuestos fenólicos de 693,1 mg, 368,3 mg y 75,7 mg de GAE por gramo de fracción soluble de lenteja, respectivamente. Además, la fracción soluble de lenteja en estas condiciones óptimas exhibiría actividades inhibidoras de la ECA de 95,9% a concentraciones de 0,5 mg/ml ( $IC_{50} = 0,14$  mg/mL) y lipasa pancreática de 39,3% a concentraciones de 2,0 mg/mL, respectivamente. El proceso combinado FLPS en las condiciones óptimas indicadas por el modelo de superficie de respuesta (pH 8,5 y tiempo ~12 h) mejoró el contenido de compuestos bioactivos y actividades biológicas de la fracción soluble de lenteja, en comparación con estudios previos realizados por nuestro grupo basados en la fermentación de lenteja con *L. plantarum* sin control de pH y la hidrólisis con la enzima Savinasa a pH 8,0. Estos procesos dieron lugar a un contenido de compuestos fenólicos de 30

mg GAE/g, actividad antioxidante de 300 mM TE/g y valor de IC<sub>50</sub> para la inhibición de la ECA de 0,20 mg/mL, en el caso de la fermentación, y 34 mg péptidos/g, actividad antioxidante de 224 mM TE/g y valor de IC<sub>50</sub> para la inhibición de ECA de 0,20 mg/ml, en el caso de la hidrólisis con Savinasa (García-Mora y col., 2014; Torino y col. 2013).

Con el fin de comparar los valores para las diferentes variables respuesta en las condiciones de pH y tiempo óptimas definidas por la función de deseabilidad con los valores experimentales obtenidos en estas condiciones, se seleccionaron las condiciones de pH 8,5 y tiempo 15 h, ya que el gráfico de deseabilidad obtenido demostró que pHs y tiempos en los rangos 8,5-8,6 y 10-26 h, respectivamente, conducían al valor máximo de deseabilidad. Teniendo en cuenta que estos valores de pH y tiempo de fermentación coincidían con uno de los experimentos de fermentación ya realizados (publicación 1), no fue necesario repetir el experimento. Se observó que los valores experimentales fueron muy similares a los valores predictivos obtenidos aplicando la MSR, no observándose diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre ellos. Por tanto, se puede considerar que los modelos predictivos obtenidos fueron adecuados para la caracterización química y biológica de la fracción soluble de lenteja procesada, y que la MSR fue una herramienta adecuada para realizar la optimización del proceso de fermentación a pH controlado utilizando *L. plantarum* y Savinasa.

Hay que señalar que la fermentación de lenteja en combinación con la hidrólisis enzimática a pH 8,5 durante 15 h proporcionó niveles de péptidos, compuestos fenólicos solubles y actividades antioxidante, antiinflamatoria, inhibidoras de la ECA y de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales 6, 1, 2, 3, 5 y 53 veces más altos que los observados en la fracción soluble de lenteja no fermentada obtenida al mismo pH. Además, el ingrediente obtenido en estas condiciones retuvo el 74% de la actividad inhibidora de la lipasa pancreática en comparación con la fracción soluble obtenida de la lenteja no fermentada.

### **5.3. FASE III: Evaluación del efecto del escalado del proceso de fermentación e hidrólisis enzimática a pH controlado en la composición y multifuncionalidad del ingrediente de lenteja desarrollado (publicación 4).**

La fase III de esta Tesis Doctoral se centró en la evaluación del efecto del escalado a nivel de planta piloto sobre el contenido y composición de compuestos bioactivos y actividad biológica del ingrediente multifuncional desarrollado a partir de la fracción soluble de lenteja mediante FLPS, en las condiciones óptimas seleccionadas en la fase II de este trabajo de Tesis (pH 8,5 durante 15 h). El escalado se realizó empleando un volumen total de producto de 30 L, en lugar de 1,5 L empleado en los ensayos de laboratorio, y se introdujeron algunas modificaciones menores. En este sentido, y teniendo en cuenta que el sodio tiene un impacto negativo en la presión arterial (Bazzano y col., 2013), la solución empleada para ajustar el pH durante el proceso a nivel de planta piloto fue KOH en lugar de NaOH, usado durante los ensayos en el laboratorio. Así mismo, el escalado se realizó a pH 8,0 en lugar de 8,5 con el fin de rentabilizar el proceso de fermentación al emplear menor volumen de solución alcalina (20%) para ajustar el pH durante la fermentación.

Con el fin de conocer si el escalado tenía alguna influencia en la multifuncionalidad del ingrediente obtenido, se comparó el rendimiento peptídico y de compuestos fenólicos, así como las actividades biológicas del ingrediente producido a escala de planta piloto con el obtenido a escala de laboratorio. El ingrediente producido a escala de planta piloto mostró un rendimiento de péptidos y compuestos fenólicos significativamente inferior (reducciones del 21% y 25%, respectivamente) que el producido a escala de laboratorio. De modo similar, se observó una menor actividad biológica en el ingrediente desarrollado en planta piloto, ya que se observaron actividades inhibitoras de la ECA, sacarasa y lipasa pancreática, así como actividad antioxidante inferiores que en el ingrediente obtenido a escala de laboratorio. La ligera reducción del pH durante el escalado podría tener un impacto negativo en la actividad proteolítica de la enzima Savinasa, que es máxima a pH 8,5, resultando en una pérdida moderada de la producción de péptidos y, por tanto, en una menor actividad biológica. Sin embargo, el escalado no afectó a la actividad maltasa del ingrediente e incrementó notablemente su actividad protectora frente al estrés oxidativo en macrófagos RAW 264.7. A pesar de la ligera pérdida de actividad biológica observada tras el escalado, un estudio reciente ha demostrado que la administración del ingrediente obtenido de la fermentación de lenteja en presencia de Savinasa en las condiciones empleadas durante el escalado redujo de manera efectiva alteraciones del metabolismo de la glucosa y del metabolismo lipídico, así como en la función hepática en un modelo experimental animal de SMet y EHNA (Martínez y col., 2018).

Concretamente, este ingrediente mejoró los parámetros e índices relacionados con la resistencia a la insulina (glucosa en sangre, área bajo la curva tras la sobrecarga oral de glucosa y perfil de la curva obtenida e índice TG/glucosa), metabolismo lipídico (niveles de TG plasmáticos, fosfolípidos, C-HDL e índice aterogénico), esteatosis hepática (contenido lipídico y composición de ácidos grasos) y estrés oxidativo (peroxidación lipídica hepática) en ratas Zucker con SMet. Los beneficios para la salud del ingrediente obtenido por fermentación de lenteja con Savinasa mostrados en el estudio de Martínez y col. (2018) son consistentes con las actividades antioxidante e inhibidoras de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales y lipasa pancreática observadas en ensayos *in vitro* en esta Tesis, y podrían atribuirse a la presencia de péptidos bioactivos y compuestos fenólicos en dicho ingrediente.

#### **5.4. FASE IV: Estudio de los mecanismos de acción antioxidante del ingrediente multifuncional desarrollado a partir de lenteja mediante fermentación e hidrólisis enzimática a pH controlado (FLPS) a escala de planta piloto (publicación 4).**

La mayor actividad protectora frente al estrés oxidativo observada en cultivos de macrófagos RAW 264.7 para el ingrediente de lenteja desarrollado a escala de planta piloto en comparación con el obtenido a escala de laboratorio nos llevó a realizar un estudio más exhaustivo de los mecanismos de acción implicados en dicha protección. Para ello, el ingrediente multifuncional obtenido a escala de planta piloto se sometió a un proceso de DGI simulada, siguiendo el protocolo de digestión estática desarrollado por Minekus y col. (2014). Este protocolo simula las condiciones fisiológicas en las fases oral, gástrica e intestinal de la digestión que van a afectar a la composición química y bioactividad de los componentes de los alimentos. Este enfoque experimental permitió comparar los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* de la actividad biológica del ingrediente con aquellos observados *in vivo* en un modelo de rata Zucker con SMet y EHNA (Martínez y col., 2018).

Para el estudio de los mecanismos de acción antioxidante, se trabajó con el ingrediente multifuncional desarrollado tras la digestión mencionada, digerido que denominaremos a partir de este momento DLF. Se empleó, para ello, un modelo celular de estrés oxidativo, macrófagos RAW 264.7 estresados por *t*-BHP (Lv y col., 2017), idéntico al empleado en la fase I de esta Tesis Doctoral, ya que esta línea celular genera una sobreproducción de ERO tras la exposición a moléculas pro-oxidantes (Zhang y col., 2018). Teniendo en cuenta que el *t*-BHP reduce la viabilidad celular y promueve la apoptosis y necrosis celular por estimulación de la producción intracelular de ERO (Lv y col., 2017), se ensayaron diferentes concentraciones de este compuesto (0,05; 0,1; 1 y 2,5 mM) para

asegurar la toxicidad celular por inducción de estrés oxidativo en macrófagos RAW 264.7. Los resultados mostraron una importante reducción de la viabilidad celular cuando se emplearon concentraciones de 0,1 mM o superiores, siendo la viabilidad menor cuanto mayor fue la concentración de agente pro-oxidante empleada, resultados coincidentes con los publicados recientemente (Lv y col., 2017). Se determinó, también, la viabilidad celular del cultivo cuando se expuso durante 18 h a concentraciones crecientes de DLF (10, 50, 75 y 100 µg/mL). No se encontraron diferencias significativas en la viabilidad celular a ninguna de las concentraciones ensayadas en comparación con el control, confirmándose la inocuidad de DLF a las dosis ensayadas. Posteriormente, con el objeto de evaluar el efecto citoprotector de DLF frente al estrés oxidativo, las células se trataron de nuevo con diversas concentraciones de DLF (10-100 µg/mL) durante 18 h y, posteriormente, con *t*-BHP (2,5 mM) durante 3 h. Se observó que DLF inhibía significativamente la muerte celular inducida por *t*-BHP a concentraciones de 75 y 100 µg/mL (42% y 61% de inhibición vs. control, respectivamente).

Posteriormente, se estudió el efecto de DLF sobre la producción de ERO intracelulares en cultivos de macrófagos RAW 264.7 estresados por exposición a concentraciones crecientes de *t*-BHP (0,05; 0,1; 1 y 2,5 mM). Se observó que la producción de ERO aumentaba de manera dosis-dependiente tras la exposición a concentraciones crecientes del agente pro-oxidante. Los niveles de ERO en las células tratadas con concentraciones crecientes de DLF (10, 50, 75 y 100 µg/mL), por el contrario, no mostraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) en comparación con el control (células no tratadas). Estos resultados indican que DLF por sí mismo no induce estrés oxidativo en el cultivo de macrófagos RAW 264.7. En cambio, el pretratamiento del cultivo de macrófagos con concentraciones crecientes de DLF (10, 50, 75 y 100 µg/mL) durante 18 h y, posteriormente, con *t*-BHP (2,5 mM) durante 3 h disminuye de modo dosis-dependiente la generación de ERO (3, 19, 32 y 67% de inhibición, respectivamente). Por tanto, el pretratamiento con DLF no sólo no afectó a la viabilidad celular, sino que atenuó la generación de radicales oxidantes en un medio fuertemente oxidante (2,5 mM de *t*-BHP). Estos resultados coinciden con los obtenidos en un estudio reciente en el que se demostró que la administración del ingrediente de lenteja (obtenido en las condiciones descritas en esta Tesis Doctoral) a ratas Zucker con SMet disminuye la producción de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico de origen hepático, un reconocido marcador de peroxidación lipídica (Martínez y col., 2018).

Numerosas evidencias científicas demuestran que el efecto citoprotector de los compuestos antioxidantes se puede atribuir a su habilidad para regular la expresión de enzimas antioxidantes (Ramachandran y Saravanan, 2013). La expresión de estas enzimas es

---

un factor crítico en la detoxificación y eliminación celular de ERO y compuestos electrófilos a través de reacciones de conjugación, mejorando la capacidad antioxidante celular. Por este motivo, con el fin de dilucidar las posibles rutas moleculares por las que DLF ejercía su efecto antioxidante, se evaluó la expresión de las enzimas antioxidantes catalasa y SOD-1 mediante la técnica western-blot. La exposición de macrófagos al agente pro-oxidante anteriormente mencionado (0,1 mM) aumentó los niveles de catalasa y SOD-1 en comparación con las células control (no tratadas con este agente). Se seleccionó para el ensayo aquella dosis de *t*-BHP que causaba la mayor viabilidad celular. El pretratamiento de las células con DLF a diferentes dosis (50, 75 y 100 µg/mL) durante 18 h y, posteriormente, con *t*-BHP (0,1 mM) durante 3 h incrementó la expresión de la proteína catalasa de una manera dosis-dependiente en comparación con las células expuestas a *t*-BHP únicamente. Por el contrario, DLF no potenció la expresión de SOD-1 inducida por exposición al pro-oxidante. La catalasa es una enzima que interviene en la conversión del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno (Finkel y Holbrook, 2000). Estos resultados sugieren que el incremento en la capacidad de defensa endógena inducida DLF podría jugar un papel crucial en la protección frente al daño celular causado por estrés oxidativo. De modo similar, otro estudio reciente ha indicado que extractos obtenidos a partir de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) inducen la expresión de enzimas antioxidantes endógenas como SOD, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa en células Caco-2 derivadas de adenocarcinoma de colon humano (Chen y col., 2017).

Otro de los mecanismos implicados en la defensa celular frente al estrés oxidativo es la activación de la ruta de señalización celular que implica al factor de transcripción Nrf2 y al elemento de respuesta antioxidante (ERA) (Nguyen y col., 2009). La activación de Nrf2 depende de aquellos mecanismos que incrementan su estabilidad, causando su acumulación en la célula. Un mecanismo ampliamente conocido que controla la estabilidad de Nrf2 está mediado por la proteína Keap1 (Nguyen y col., 2009). En condiciones normales, Nrf2 es inactivo ya que se encuentra unido a Keap1, que acelera su degradación. En condiciones de estrés oxidativo, Nrf2 se separa de la proteína Keap1 debido a la modificación de cisteínas reactivas en este factor de transcripción, fenómeno que conduce a su estabilización y activación. En estas condiciones, Nrf2 migra al núcleo, donde se une al ERA activándose la síntesis de enzimas antioxidantes (Kobayashi y col., 2006). Por este motivo, se estudió la posibilidad de que otro de los mecanismos de acción de DLF estuviese mediado por la activación de la cascada de señalización celular Nrf2-ERA en macrófagos RAW 264.7. Se evaluó, por tanto, el efecto de DLF en la expresión y translocación nuclear del factor de transcripción Nrf2 mediante western-blot. Para ello, los macrófagos RAW 264.7 se pretrataron con DLF (50,

75 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 18 h y, posteriormente, con *t*-BHP (0,1 mM) durante 3 h y se determinó la presencia de Nrf2 en la fracción nuclear. Se observó un incremento significativo ( $p \leq 0,05$ ) dosis-dependiente de los niveles de Nrf2 en el núcleo. Estos resultados confirman que DLF induce la translocación y acumulación de Nrf2 en el núcleo celular, fenómeno necesario para que ejerza su actividad. Estos hallazgos, además, consistentes con el aumento de la expresión de la enzima catalasa observado, sugieren un claro mecanismo regulador que promueve la estabilización de Nrf2 en respuesta al tratamiento con DLF y la inducción de la expresión de enzimas antioxidantes a través de la unión de Nrf2 a ERA. Resultados similares se observaron en un estudio realizado en judía común (*Phaseolus vulgaris* L.), donde se demostró que un extracto procedente de esta legumbre fermentada activó la expresión de enzimas antioxidantes y detoxificantes a través de la activación de la ruta de señalización mediada por Nrf2, reduciendo el estrés inducido por peróxido de hidrógeno en el retículo endoplásmico (La Marca y col., 2015).

La activación del factor de transcripción Nrf2 también puede tener lugar por la fosforilación de residuos específicos de serina y/o tirosina, fenómeno mediado por otras rutas de transducción de señal que incluyen las MAPK, fosfatidilinositol-3-quinasas/proteína quinasa B o la proteína quinasa C  $\delta$  (Lv y col., 2017; Niture y col., 2014). Al igual que otros miembros de la familia de las MAPK, las proteínas SAPK/JNK se activan por la fosforilación dual de los residuos Thr 183 y Tyr 185 mediada por las quinasas MKK4 y MKK7 que actúan al inicio en esta vía de señalización celular (Davis, 1999). Con el fin de profundizar en los mecanismos reguladores de DLF implicados en la acumulación nuclear de Nrf2, se estudió su efecto en los niveles de proteínas SAPK/JNK fosforiladas. Para ello, los macrófagos RAW 264.7 se trataron con concentraciones crecientes de DLF (50, 75 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 6 h y se cuantificaron tanto los niveles de SAPK/JNK totales como fosforiladas mediante western-blot. Las células tratadas mostraron un aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) y, nuevamente, dosis-dependiente de los niveles de SAPK/JNK fosforilada. En cambio, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los niveles totales de SAPK/JNK en las células tratadas con DLF en comparación con las células control. La relación entre los niveles de SAPK/JNK fosforilada total aumentó ( $p \leq 0,05$ ) en las células tras el tratamiento con DLF de manera dosis-dependiente. Estos resultados indican que DLF induce la fosforilación de SAPK/JNK y la activación de esta ruta podría estar asociada a la activación de la vía mediada por el factor de transcripción Nrf2. Hay que señalar que la activación de la expresión de enzimas antioxidantes inducida por DLF, a través de diversos mecanismos que implican la activación de las rutas Nrf2/SAPK/JNK, se ha demostrado por primera vez en la presente Tesis Doctoral.

Tras conocer los mecanismos por los que DLF ejerce su acción antioxidante, el último objetivo de esta Tesis Doctoral consistió en establecer una relación entre el efecto citoprotector frente al estrés oxidativo observado con su composición peptídica y fenólica. Se llevó a cabo una caracterización de la fracción peptídica de digerido DLF mediante HPLC-MS/MS, identificándose 7 péptidos con pesos moleculares comprendidos entre 839 y 2768 Da, que derivaban de las principales proteínas de lenteja (convicilina, alergeno Len c 1.0101 y vicilina tipo C). Dos de las secuencias identificadas (EQSPGQWRPSHGKEEDEEEK y EQSPGQWRPSHGKEEDEEKEQK), derivadas de la convicilina, se habían observado previamente en ingrediente de lenteja antes de la digestión *in vitro* (publicación 1), indicando la resistencia de estos péptidos a la DGI. El análisis exhaustivo de la estructura de los péptidos identificados puso de manifiesto que contenían prolina, histidina o tirosina, o bien aminoácidos hidrofóbicos en el extremo N y/o C-terminal que, como se ha explicado anteriormente, son determinantes para que los péptidos puedan ejercer su actividad antioxidante (Li y Li, 2013). Además, los péptidos identificados presentaron en su secuencia ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, lisina o histidina. Se ha demostrado que los grupos carboxilo o amino de los amino ácidos básicos y ácidos actúan como quelantes de metales (Díaz y col., 2003). Estas características estructurales encontradas en los péptidos identificados en DLF sugieren su posible contribución a la reducción de los niveles de ERO intracelulares en macrófagos estresados por *t*-BHP a través de su actividad captadora de radicales libres. Además, existen evidencias que señalan la acción antioxidante de oligopéptidos derivados de legumbres a través de la activación de los mecanismos de defensa antioxidante celulares. En este sentido, el péptido NRYHE derivado de garbanzo induce la expresión de Nrf2 y participa, por tanto, en la activación de ciertas enzimas antioxidantes mediada por ARE, como la NADP (H): quinona oxidoreductasa 1, la hemo oxigenasa 1, y la  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetasa en células HT-29 y Caco-2 tratadas por peróxido de hidrógeno (Guo y col., 2014).

La caracterización de la fracción fenólica permitió la identificación de 8 compuestos fenólicos en DLF, derivados fundamentalmente de ácidos fenólicos (ácido feruloilquínico, derivados del ácido gálico y el glucurónido del ácido cafeico), aunque también se encontraron flavonoles (kenferol rutinósido-ramnósido y glucurónido de quercetina). Se encontró un compuesto más, con una relación masa/carga ( $m/z$ ) de 659 y fragmentos de masa 468 y 298, que no se logró identificar, a pesar de ser el compuesto más abundante en DLF. El perfil fenólico de DLF contrasta con el observado en ingrediente previo a la DGI (publicación 1), donde los flavonoles (glucósidos y agliconas de kenferol y glucurónido de isoramnetina) fueron los compuestos fenólicos más abundantes, seguidos de los flavan-3-oles (catequina, glucósido

de catequina y dímeros de prodelfinidina), siendo los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos los minoritarios. Los compuestos fenólicos identificados en DLF podrían potenciar la actividad antioxidante de los péptidos anteriormente descritos presentes en este ingrediente. Estudios previos han demostrado que los compuestos fenólicos presentes en DLF neutralizan radicales y se unen a iones metálicos a través de mecanismos de donación de electrones, hidrógeno o un mecanismo mixto (Ganesan y Xu, 2017). Sin embargo, sólo algunos de estos compuestos son capaces de activar el sistema Keap1-Nrf2. Así, por ejemplo, las agliconas y glucósidos de kenferol han demostrado efectos protectores frente al estrés oxidativo a través de la activación de la respuesta defensiva mediada por Nrf2 en tejido pulmonar (Kim y col., 2017). De forma similar, el ácido gálico, la quercetina y el glucósido de quercetina protegen frente a la hepatotoxicidad inducida por estrés oxidativo mediante la activación de la vía Keap1-Nrf2 (Feng y col., 2017; Joko y col., 2017; Kim y col., 2017). Estudios de relación estructura-actividad han revelado que los compuestos fenólicos que contienen grupos hidroxilo son antioxidantes bifuncionales, ya que ejercen su papel protector a través de la captación de compuestos oxidantes e inducción de la expresión de enzimas citoprotectoras (Dinkova-Kostova y Talalay, 2008).



# **Conclusiones**





## 6. CONCLUSIONES

1. La fermentación con *L. plantarum* en combinación con la hidrólisis con Savinasa 16 L a pH controlado es una estrategia más efectiva que los dos procesos realizados separadamente para mejorar el contenido y bioaccesibilidad de compuestos bioactivos y el potencial multifuncional del ingrediente de lenteja, tanto si se realiza a pH básico (8,5) como neutro (6,8). En particular, el proceso combinado incrementa el contenido de péptidos y de ciertos flavonoides y ácidos fenólicos, así como las actividades antioxidante e inhibidoras de la ECA y de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales en la fracción de lenteja mencionada, en mayor medida que los procesos realizados individualmente.
2. La enzima Savinasa contribuyó, fundamentalmente, a la liberación de péptidos y al aumento de la actividad inhibidora de la ECA y antioxidante del ingrediente de lenteja obtenido mediante el proceso combinado en ambas condiciones, mientras que *L. plantarum* fue responsable, principalmente, de la modificación de la composición fenólica y del aumento de la actividad inhibidora de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales y lipasa pancreática.
3. La fracción soluble de lenteja obtenida mediante el proceso combinado a pH alcalino mostró la presencia de 30 fragmentos proteicos derivados de las proteínas convicilina, vicilina y lectina con características estructurales relacionadas con actividades antioxidante e inhibidoras de la ECA y de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales, así como glucósidos de kenferol. En condiciones neutras se observaron, sin embargo, 3 péptidos con las características estructurales mencionadas, así como flavonoides y derivados de ácido gálico.
4. La digestión gastrointestinal *in vitro* realizada simulando las condiciones fisiológicas de la fracción soluble de lenteja obtenida mediante el proceso combinado a ambas condiciones mejoró la bioaccesibilidad de péptidos y compuestos fenólicos y causó una disminución en el conjunto global de actividades biológicas del producto de lenteja desarrollado.
5. El pH y la duración del proceso combinado de fermentación e hidrólisis enzimática fueron factores cruciales ya que afectaron notablemente al contenido de compuestos bioactivos y a la actividad biológica del ingrediente de lenteja. La optimización de ambos parámetros mediante la metodología de superficie de respuesta indicó que las condiciones óptimas para alcanzar el máximo rendimiento en la producción de péptidos y compuestos fenólicos así como el mayor potencial multifuncional del ingrediente de lenteja fueron valores de pH de 8,5 y tiempo 11 h y 36 min.

6. El escalado a nivel de planta piloto del proceso de fermentación en combinación con la hidrólisis enzimática causó una disminución del contenido de proteínas, péptidos y compuestos fenólicos y de la eficacia biológica global del ingrediente de lenteja en comparación con el proceso realizado a escala de laboratorio, si bien mostró mayor actividad citoprotectora frente al estrés oxidativo en un modelo celular de macrófagos RAW 264.7 inducido por *t*-BHP.

7. El ingrediente obtenido a partir de lenteja mediante el proceso de fermentación combinado con hidrólisis enzimática a escala de planta piloto ejerció un efecto citoprotector frente al estrés oxidativo tras su digestión gastrointestinal, mediado por la activación de las rutas de señalización de las jun-quinasas, la translocación al núcleo de Nfr2 y la expresión de enzimas antioxidantes como la catalasa. Este efecto citoprotector frente al estrés oxidativo se relacionó con la presencia de ciertos oligopéptidos derivados de la convicilina, alérgeno Len C 1.1001 y vicilina de tipo B, así como de ciertos ácidos fenólicos y flavonoles identificados en el ingrediente digerido de lenteja.

#### **CONCLUSIÓN GENERAL**

La fermentación de lenteja con *L. plantarum* en combinación con hidrólisis con Savinasa en condiciones alcalinas y tiempos cortos es una estrategia de interés para la obtención de un ingrediente multifuncional que puede contribuir a la prevención y control del Síndrome Metabólico.

# **Bibliografía**





## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A. y Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, *152*, 46-55.
- Afonso, J., Passos, C. P., Coimbra, M. A., Silva, C. M. y Soares-da-Silva, P. (2013). Inhibitory effect of phenolic compounds from grape seeds (*Vitis vinifera* L.) on the activity of angiotensin I converting enzyme. *LWT - Food Science and Technology*, *54*, 265-270.
- Aguilar, M., Bhuket, T., Torres, S., Liu, B. y Wong, R. J. (2015). Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003-2012. *Journal of the American Medical Association*, *313*, 1973-1974.
- Aguilera, Y., Dueñas, M., Estrella, I., Hernández, T., Benitez, V., Esteban, R. M. y Martín-Cabrejas, M. A. (2010). Evaluation of phenolic profile and antioxidant properties of Pardina lentil as affected by industrial dehydration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 10101-10108.
- Albuquerque, B. R., Prieto, M. A., Barros, L. y Ferreira, I. C. F. R. (2017). Assessment of the stability of catechin-enriched extracts obtained from *Arbutus unedo* L. fruits: Kinetic mathematical modeling of pH and temperature properties on powder and solution systems. *Industrial Crops and Products*, *99*, 150-162.
- Alegría-Ezquerro, E., Castellano-Vázquez, J. M. y Alegría-Barrero, A. (2008). Obesidad, síndrome metabólico y diabetes: implicaciones cardiovasculares y actuación terapéutica. *Revista Española de Cardiología*, *61*, 752-764.
- Alminger, M., Aura, A. M., Bohn, T., Dufour, C., El, S. N., Gomes, A., Karakaya, S., Martínez-Cuesta, M. C., McDougall, G. J., Requena, T. y Santos, C. N. (2014). *In vitro* models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*, 413-436.
- Alshikh, N., de Camargo, A. C. y Shahidi, F. (2015). Phenolics of selected lentil cultivars: Antioxidant activities and inhibition of low-density lipoprotein and DNA damage. *Journal of Functional Foods*, *18*, 1022-1038.
- Aluko, R. E. (2015). Antihypertensive peptides from food proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, *6*, 235-262.
- Amiri, M. y Naim, H. Y. (2017). Characterization of mucosal disaccharidases from human intestine. *Nutrients*, *9*, 1106.

- Arnoldi, A., Zanoni, C., Lammi, C. y Boschini, G. (2015). The role of grain legumes in the prevention of hypercholesterolemia and hypertension. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, 144-168.
- Ascaso, J. F., González-Santos, P., Hernández Mijares, A., Mangas Rojas, A., Masana Marín, L., Millán Núñez-Cortés, J., Pallardo, L. F., Pedro-Botet, J., Pérez-Jiménez, F., Pintó, X., Plaza, I., Rubiés-Prat, J. y Zúñiga, M. (2006). Diagnóstico de síndrome metabólico. Adecuación de los criterios diagnósticos en nuestro medio. Recomendaciones del foro HDL. Resumen ejecutivo. *Revista Clínica Española*, 206, 576-582.
- Augustin, M. A., Sanguansri, L., Rusli, J. K., Shen, Z., Cheng, L. J., Keogh, J. y Clifton, P. (2014). Digestion of microencapsulated oil powders: *in vitro* lipolysis and *in vivo* absorption from a food matrix. *Food and Function*, 5, 2905-2912.
- Barrios-Gonzalez, J., Fernández, F., Tomasini, A. y Mejía, A. (2005). Secondary metabolites production by solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology* 1, 1-6.
- Bazzano, L. A., Green, T., Harrison, T. N. y Reynolds, K. (2013). Dietary approaches to prevent hypertension. *Current Hypertension Reports*, 15, 694-702.
- Belwal, T., Ezzat, S. M., Rastrelli, L., Bhatt, I. D., Daglia, M., Baldi, A., Devkota, H. P., Orhan, I. E., Patra, J. K., Das, G., Anandharamakrishnan, C., Gomez-Gomez, L., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M. y Atanasov, A. G. (2018). A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *Trends in Analytical Chemistry*, 100, 82-102.
- Bendtsen, L. Q., Lorenzen, J. K., Bendtsen, N. T., Rasmussen, C. y Astrup, A. (2013). Effect of dairy proteins on appetite, energy expenditure, body weight, and composition: A review of the evidence from controlled clinical trials. *Advances in Nutrition*, 4, 418-438.
- Boelsma, E. y Kloek, J. (2008). Lactotripeptides and antihypertensive effects: A critical review. *British Journal of Nutrition*, 101, 776-786.
- Bouayed, J., Hoffmann, L. y Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128, 14-21.
- Boudreau, D. M., Malone, D. C., Raebel, M. A., Fishman, P. A., Nichols, G. A., Feldstein, A. C., Boscoe, A. N., Ben-Joseph, R. H., Magid, D. J. y Okamoto, L. J. (2009). Health care utilization and costs by metabolic syndrome risk factors. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 7, 305-313.
- Bray, G. A., Smith, S. R., de Jonge, L., Xie, H., Rood, J., Martin, C. K., Most, M., Brock, C., Mancuso, S. y Redman, L. M. (2012). Effect of dietary protein content on weight gain,

- energy expenditure, and body composition during overeating: a randomized controlled trial. *Journal of American Medical Association*, *307*, 47-55.
- Briante, R., Patumi, M., Terenziani, S., Bismuto, E., Febbraio, F. y Nucci, R. (2002). *Olea europaea* L. leaf extract and derivatives: antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 4934-4940.
- Brien, N. M., Woods, J. A., Aherne, S. A. y Callaghan, Y. C. (2000). Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochemical Society Transactions*, *28*, 22-26.
- Bubelová, Z., Sumczynski, D. y Salek, R. N. (2018). Effect of cooking and germination on antioxidant activity, total polyphenols and flavonoids, fiber content, and digestibility of lentils (*Lens culinaris* L.). *Journal of Food Processing and Preservation*, *42*, e13388. DOI: 10.1111/jfpp.13388.
- Buchholz, T. y Melzig, M. F. (2015). Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors. *Planta Medica*, *81*, 771-783.
- Burgos-Edwards, A., Jiménez-Aspee, F., Thomas-Valdés, S., Schmeda-Hirschmann, G. y Theoduloz, C. (2017). Qualitative and quantitative changes in polyphenol composition and bioactivity of *Ribes magellanicum* and *R. punctatum* after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, *237*, 1073-1082.
- Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G. y Oomah, B. D. (2010). Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Research International*, *43*, 461-482.
- Cao, Y. y Xiong, Y. L. (2017). Interaction of whey proteins with phenolic derivatives under neutral and acidic pH conditions. *Journal of Food Science*, *82*, 409-419.
- Chandra-Hioe, M. V., Wong, C. H. M. y Arcot, J. (2016). The potential use of fermented chickpea and faba bean flour as food ingredients. *Plant Foods for Human Nutrition*, *71*, 90-95.
- Chandrasekara, A. y Shahidi, F. (2010). Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 6706-6714.
- Chen, Y., Liu, W., Xue, J., Yang, J., Chen, X., Shao, Y., Kwok, L.-Y., Bilige, M., Mang, L. y Zhang, H. (2014). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of *Lactobacillus helveticus* strains from traditional fermented dairy foods and antihypertensive effect of fermented milk of strain H9. *Journal of Dairy Science*, *97*, 6680-6692.
- Chen, P. X., Zhang, H., Marcone, M. F., Pauls, K. P., Liu, R., Tang, Y., Zhang, B., Renaud, J. B. y Tsao, R. (2017). Anti-inflammatory effects of phenolic-rich cranberry bean (*Phaseolus*

- vulgaris* L.) extracts and enhanced cellular antioxidant enzyme activities in Caco-2 cells. *Journal of Functional Foods*, 38, 675-685.
- Coda, R., Rizzello, C. G., Pinto, D. y Gobbetti, M. (2012). Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1087-1096.
- Cordero, A., Alegría, E. y León, M. (2005). Prevalencia de síndrome metabólico. *Revista Española de Cardiología*, 5(Suppl. D), 11-15.
- Cordero-Herrera, I., Martín María, A., Bravo, L., Goya, L. y Ramos, S. (2013). Cocoa flavonoids improve insulin signalling and modulate glucose production via AKT and AMPK in HepG2 cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57, 974-985.
- Cornier, M. A., Dabelea, D., Hernandez, T. L., Lindstrom, R. C., Steig, A. J., Stob, N. R., Van Pelt, R. E., Wang, H. y Eckel, R. H. (2008). The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*, 29, 777-822.
- Crowe, K. M. y Francis, C. (2013). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Functional foods. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 113, 1096-1103.
- Da Silva, R. P. F. F., Rocha-Santos, T. A. P. y Duarte, A. C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40-51.
- Daskaya-Dikmen, C., Yucetepe, A., Karbancioglu-Guler, F., Daskaya, H. y Ozcelik, B. (2017). Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from plants. *Nutrients*, 9, 316.
- Davis, R. J. (1999). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochemical Society Symposia*, 64, 1-12.
- Day, C. (2007). Metabolic syndrome, or What you will: Definitions and epidemiology. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 4, 32-38.
- De Angelis, M., Calasso, M., Cavallo, N., Di Cagno, R. y Gobbetti, M. (2016). Functional proteomics within the genus *Lactobacillus*. *Proteomics*, 16, 946-962.
- De Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2015). Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*, 74, 185-198.
- De la Iglesia, R., Loria-Kohen, V., Zulet, M. A., Martinez, J. A., Reglero, G. y Ramirez de Molina, A. (2016). Dietary strategies implicated in the prevention and treatment of metabolic syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1877.
- De Sousa, S. M. C. D. y Norman, R. J. P. (2016). Metabolic syndrome, diet and exercise. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 37, 140-151.

- Delgado-Andrade, C., Olías, R., Jiménez-López, J. C. y Clemente, A. (2016). Nutritional and beneficial effects of grain legumes on human health. *Arbor*, 192, a313. DOI: 10.3989/arbor.2016.779n3003.
- Derringer, G. y Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, 21, 214-219.
- Devi, K. P., Malar, D. S., Nabavi, S. F., Sureda, A., Xiao, J., Nabavi, S. M. y Daglia, M. (2015). Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacological Research*, 99, 1-10.
- Di Luccio, M., Capra, F., Ribeiro, N. P., Vargas, G. D. L. P., Freire, D. M. G. y de Oliveira, D. (2004). Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113, 173-180.
- Díaz, M., Dunn, C. M., McClements, D. J. y Decker, E. A. (2003). Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2365-2370.
- Dimitrov, Z., Chorbadjiyska, E., Gotova, I., Pashova, K. y Ilieva, S. (2015). Selected adjunct cultures remarkably increase the content of bioactive peptides in Bulgarian white brined cheese. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 29, 78-83.
- Dinkova-Kostova Albena, T. y Talalay, P. (2008). Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52, S128-S138.
- Dueñas, M., Hernández, T. y Estrella, I. (2002). Phenolic composition of the cotyledon and the seed coat of lentils (*Lens culinaris* L.). *European Food Research and Technology*, 215, 478-483.
- Dueñas, M., Sun, B., Hernández, T., Estrella, I., & Spranger, M. I. (2003). Proanthocyanidin composition in the seed coat of lentils (*Lens culinaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7999-8004.
- Dueñas, M., Fernández, D., Hernández, T., Estrella, I. y Muñoz, R. (2004). Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 297-304.
- Egert, S., Boesch-Saadatmandi, C., Wolfram, S., Rimbach, G. y Müller, M. J. (2010). Serum lipid and blood pressure responses to quercetin vary in overweight patients by apolipoprotein E genotype. *The Journal of Nutrition*, 140, 278-284.

- Elnakish Mohammad, T., Hassanain Hamdy, H., Janssen Paul, M., Angelos Mark, G. y Khan, M. (2013). Emerging role of oxidative stress in metabolic syndrome and cardiovascular diseases: Important role of Rac/NADPH oxidase. *The Journal of Pathology*, 231, 290-300.
- Ervin, R. B. (2009). Prevalence of metabolic syndrome among adults 20 years of age and over, by sex, age, race and ethnicity, and body mass index: United States, 2003-2006. *National Health Statistics Reports*, 5, 1-7.
- Esposito, K., Maiorino, M. I., Bellastella, G., Chiodini, P., Panagiotakos, D. y Giugliano, D. (2015). A journey into a Mediterranean diet and type 2 diabetes: a systematic review with meta-analyses. *BMJ Open*, 5, e008222. DOI : 10.1136/bmjopen-2015-008222.
- Esteban-Torres, M., Landete, J. M., Reverón, I., Santamaría, L., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2015). A *Lactobacillus plantarum* esterase active on a broad range of phenolic esters. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 3235-3242.
- Esteban-Torres, M., Reverón, I., Santamaría, L., Mancheño, J. M., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2016). The Lp\_3561 and Lp\_3562 enzymes support a functional divergence process in the lipase/esterase toolkit from *Lactobacillus plantarum*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1118.
- Faris, M. e. A.-I. E., Takturi, H. R. y Issa, A. Y. (2013). Role of lentils (*Lens culinaris* L.) in human health and nutrition: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 6, 3-16.
- Feng, R.-B., Wang, Y., He, C., Yang, Y. y Wan, J.-B. (2017). Gallic acid, a natural polyphenol, protects against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity by activating ERK-Nrf2-Keap1-mediated antioxidative response. *Food and Chemical Toxicology*, DOI: 10.1016/j.fct.2017.10.033.
- Fernández-Bergés, D., Cabrera de León, A., Sanz, H., Elosua, R., Guembe, M. J., Alzamora, M., Vega-Alonso, T., Félix-Redondo, F. J., Ortiz-Marrón, H., Rigo, F., Lama, C., Gavrila, D., Segura-Fragoso, A., Lozano, L. y Marrugat, J. (2012). Síndrome metabólico en España: prevalencia y riesgo coronario asociado a la definición armonizada y a la propuesta por la OMS. Estudio DARIOS. *Revista Española de Cardiología*, 65, 241-248.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A. y Hornero-Méndez, D. (2012). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 46, 438-450.
- Filannino, P., Di Cagno, R. y Gobbetti, M. (2018). Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 64-72.

- Finer, N., James, W. P., Kopelman, P. G., Lean, M. E. y Williams, G. (2000). One-year treatment of obesity: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre study of orlistat, a gastrointestinal lipase inhibitor. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 24, 306-313.
- Finkel, T. y Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239-247.
- Fleming, J. A. y Kris-Etherton, P. M. (2014). The evidence for alpha-linolenic acid and cardiovascular disease benefits: Comparisons with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Advances in Nutrition*, 5, S863-S876.
- Fontana Pereira, D., Cazarolli, L. H., Lavado, C., Mengatto, V., Figueiredo, M. S. R. B., Guedes, A., Pizzolatti, M. G. y Silva, F. R. M. B. (2011). Effects of flavonoids on  $\alpha$ -glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition*, 27, 1161-1167.
- Gamboa-Gómez, C. I., Muñoz-Martínez, A., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Moreno-Jiménez, M. R., González-Herrera, S. M., Soto-Cruz, O. y González-Laredo, R. F. (2016). Changes in phytochemical and antioxidant potential of tempeh common bean flour from two selected cultivars influenced by temperature and fermentation time. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40, 270-278.
- Gan, R. Y., Shah, N. P., Wang, M. F., Lui, W. Y. y Corke, H. (2016). Fermentation alters antioxidant capacity and polyphenol distribution in selected edible legumes. *International Journal of Food Science and Technology*, 51, 875-884.
- Ganesan, K., & Xu, B. (2017). Polyphenol-rich lentils and their health promoting effects. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2390.
- Gänzle, M. G. (2014). Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiology*, 37, 2-10.
- García-Mora, P., Peñas, E., Frias, J. y Martínez-Villaluenga, C. (2014). Savinase, the most suitable enzyme for releasing peptides from lentil (*Lens culinaris* var. Castellana) protein concentrates with multifunctional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 4166-4174.
- García-Mora, P., Frias, J., Peñas, E., Zieliński, H., Giménez-Bastida, J. A., Wiczowski, W., Zielińska, D. y Martínez-Villaluenga, C. (2015a). Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) proteins by subtilisins. *Journal of Functional Foods*, 18, 319-332.
- García-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., Gomez, R. y Martínez-Villaluenga, C. (2015b). High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I

- converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. *Food Chemistry*, 171, 224-232.
- García-Mora, P., Martín-Martínez, M., Bonache, M. A., González-Múniz, R., Peñas, E., Frias, J. y Martínez-Villaluenga, C. (2017). Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. *Food Chemistry*, 221, 464-472.
- García-Toro, M., Vicens-Pons, E., Gili, M., Roca, M., Serrano-Ripoll, M. J., Vives, M., Leiva, A., Yáñez, A. M., Bannasar-Veny, M. y Oliván-Blázquez, B. (2016). Obesity, metabolic syndrome and Mediterranean diet: Impact on depression outcome. *Journal of Affective Disorders*, 194, 105-108.
- Gericke, B., Schecker, N., Amiri, M. y Naim, H. Y. (2017). Structure-function analysis of human sucrase-isomaltase identifies key residues required for catalytic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 292, 11070-11078.
- Ghribi, A. M., Sila, A., Przybylski, R., Nedjar-Arroume, N., Makhlof, I., Blecker, C., Attia, H., Dhulster, P., Bougatef, A., & Besbes, S. (2015). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrate. *Journal of Functional Foods*, 12, 516-525.
- Gibbs, B. B., Brancati, F. L., Chen, H., Coday, M., Jakicic, J. M., Lewis, C. E., Stewart, K. J. y Clark, J. M. (2014). Effect of improved fitness beyond weight loss on cardiovascular risk factors in individuals with type 2 diabetes in the Look AHEAD study. *European Journal of Preventive Cardiology*, 21, 608-617.
- Giusti, F., Caprioli, G., Ricciutelli, M., Vittori, S. y Sagratini, G. (2017). Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour. *Food Chemistry*, 221, 689-697.
- Gonzalez-Gonzalez, C., Gibson, T. y Jauregi, P. (2013). Novel probiotic-fermented milk with angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced by *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 131-137.
- Grams, J. y Garvey, W. T. (2015). Weight loss and the prevention and treatment of type 2 diabetes using lifestyle therapy, pharmacotherapy, and bariatric surgery: Mechanisms of action. *Current Obesity Reports*, 4, 287-302.
- Grosso, G., Marventano, S., Yang, J., Micek, A., Pajak, A., Scalfi, L., Galvano, F. y Kales, S. N. (2017). A comprehensive meta-analysis on evidence of Mediterranean diet and cardiovascular disease: Are individual components equal?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 3218-3232.

- 
- Grundy, S. M. (2016). Metabolic syndrome update. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 26, 364-373.
- Gu, Y. y Wu, J. (2013). LC-MS/MS coupled with QSAR modeling in characterising of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean proteins. *Food Chemistry*, 141(3), 2682-2690.
- Guerrero, L., Castillo, J., Quiñones, M., Garcia-Vallvé, S., Arola, L., Pujadas, G. y Muguerza, B. (2012). Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: Structure-activity relationship studies. *PLoS ONE*, 7, e49493. DOI: 10.1371/journal.pone.0049493.
- Guo, Y., Zhang, T., Jiang, B., Miao, M. y Mu, W. (2014). The effects of an antioxidative pentapeptide derived from chickpea protein hydrolysates on oxidative stress in Caco-2 and HT-29 cell lines. *Journal of Functional Foods*, 7, 719-726.
- Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L. y Dary-Mourot, A. (2014). Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Research International*, 63, 71-80.
- Harasym, J. y Oledzki, R. (2014). Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. *Nutrition*, 30, 511-517.
- Havel, P. J. (2004). Update on adipocyte hormones: Regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes*, 53, S143-S151.
- Hedrén, E., Diaz, V. y Svanberg, U. (2002). Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an *in vitro* digestion method. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, 425-430.
- Hermisdorff, H. H., Zulet, M. A., Abete, I. y Martinez, J. A. (2011). A legume-based hypocaloric diet reduces proinflammatory status and improves metabolic features in overweight/obese subjects. *European Journal of Nutrition*, 50, 61-69.
- Ho, S., Thoo, Y. Y., Young, D. J. y Siow, L. F. (2017). Cyclodextrin encapsulated catechin: Effect of pH, relative humidity and various food models on antioxidant stability. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 232-239.
- Hosseinpour-Niazi, S., Mirmiran, P., Sohrab, G., Hosseini-Esfahani, F. y Azizi, F. (2011). Inverse association between fruit, legume, and cereal fiber and the risk of metabolic syndrome: Tehran lipid and glucose study. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 94, 276-283.
- Hosseinpour-Niazi, S., Mirmiran, P., Amiri, Z., Hosseini-Esfahani, F., Shakeri, N. y Azizi, F. (2012). Legume intake is inversely associated with metabolic syndrome in adults. *Archives of Iranian Medicine*, 15, 538-544.

- Howard, A. y Udenigwe, C. C. (2013). Mechanisms and prospects of food protein hydrolysates and peptide-induced hypolipidaemia. *Food and Function*, *4*, 40-51.
- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y.-C., Choi, I. y Kim, G.-B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, *160*, 346-356.
- Ibrahim, M. A., Koorbanally, N. A. y Islam, M. S. (2014). Antioxidative activity and inhibition of key enzymes linked to type-2 diabetes ( $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase) by *Khaya senegalensis*. *Acta Pharmaceutica*, *64*, 311-324.
- Ibrahim, M. A., Bester, M. J., Neitz, A. W. H. y Gaspar, A. R. M. (2018). Structural properties of bioactive peptides with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. *Chemical Biology and Drug Design*, *91*, 370-379.
- Jakubczyk, A., Karaś, M., Baraniak, B. y Pietrzak, M. (2013). The impact of fermentation and *in vitro* digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from pea proteins. *Food Chemistry*, *141*, 3774-3780.
- Jakubczyk, A. y Baraniak, B. (2014). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides obtained after *in vitro* hydrolysis of pea (*Pisum sativum* var. Bajka) globulins. *BioMed Research International*, *2014*, 438459. DOI: 10.1155/2014/438459.
- Jakubczyk, A., Karaś, M., Złotek, U. y Szymanowska, U. (2017). Identification of potential inhibitory peptides of enzymes involved in the metabolic syndrome obtained by simulated gastrointestinal digestion of fermented bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Food Research International*, *100*, 489-496.
- Jang, E. H., Moon, J. S., Ko, J. H., Ahn, C. W., Lee, H. H., Shin, J. K., Park, C. S. y Kang, J. H. (2008). Novel black soy peptides with antiobesity effects: activation of leptin-like signaling and AMP-activated protein kinase. *International Journal of Obesity*, *32*, 1161-1170.
- Jarpa-Parra, M. (2018). Lentil protein: a review of functional properties and food application. An overview of lentil protein functionality. *International Journal of Food Science and Technology*, *53*, 892-903.
- Joko, S., Watanabe, M., Fuda, H., Takeda, S., Furukawa, T., Hui, S.-P., Shrestha, R. y Chiba, H. (2017). Comparison of chemical structures and cytoprotection abilities between direct and indirect antioxidants. *Journal of Functional Foods*, *35*, 245-255.
- Kapravelou, G., Martínez, R., Andrade, A. M., López Chaves, C., López-Jurado, M., Aranda, P., Arrebola, F., Cañizares, F. J., Galisteo, M. y Porres, J. M. (2015). Improvement of the antioxidant and hypolipidaemic effects of cowpea flours (*Vigna unguiculata*) by fermentation: results of *in vitro* and *in vivo* experiments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*, 1207-1216.

- Kastorini, C. M., Milionis, H. J., Esposito, K., Giugliano, D., Goudevenos, J. A. y Panagiotakos, D. B. (2011). The effect of mediterranean diet on metabolic syndrome and its components: A meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals. *Journal of the American College of Cardiology*, *57*, 1299-1313.
- Kawaguchi, K., Mizuno, T., Aida, K. y Uchino, K. (1997). Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *61*, 102-104.
- Kesse-Guyot, E., Ahluwalia, N., Lassale, C., Hercberg, S., Fezeu, L. y Lairon, D. (2013). Adherence to Mediterranean diet reduces the risk of metabolic syndrome: A 6-year prospective study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *23*, 677-683.
- Kim, K. M., Im, A. R., Lee, S. y Chae, S. (2017). Dual protective effects of flavonoids from *Petasites japonicus* against UVB-induced apoptosis mediated via HSF-1 activated heat shock proteins and Nrf2-activated heme oxygenase-1 pathways. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *40*, 765-773.
- Kitano-Okada, T., Ito, A., Koide, A., Nakamura, Y., Han, K. H., Shimada, K., Sasaki, K., Ohba, K., Sibayama, S. y Fukushima, M. (2012). Anti-obesity role of adzuki bean extract containing polyphenols: *in vivo* and *in vitro* effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *92*, 2644-2651.
- Kobayashi, A., Kang, M. I., Watai, Y., Tong, K. I., Shibata, T., Uchida, K. y Yamamoto, M. (2006). Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Molecular and Cellular Biology*, *26*, 221-229.
- Kokubo, Y. (2014). Prevention of hypertension and cardiovascular diseases: A comparison of lifestyle factors in Westerners and East Asians. *Hypertension*, *63*, 655-660.
- Konar, N. (2013). Non-isoflavone phytoestrogenic compound contents of various legumes. *European Food Research and Technology*, *236*(3), 523-530.
- Kou, X., Gao, J., Zhang, Z., Wang, H. y Wang, X. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*, *50*, 591-598.
- Krishnan, V., Gothwal, S., Dahuja, A., Vinutha, T., Singh, B., Jolly, M., Praveen, S. y Sachdev, A. (2018). Enhanced nutraceutical potential of gamma irradiated black soybean extracts. *Food Chemistry*, *245*, 246-253.
- Kumar, H., Kim, I. S., More, S. V., Kim, B. W. y Choi, D. K. (2014). Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Natural Product Reports*, *31*, 109-139.

- Kwaw, E., Ma, Y., Tchabo, W., Apaliya, M. T., Wu, M., Sackey, A. S., Xiao, L. y Tahir, H. E. (2018). Effect of *Lactobacillus* strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice. *Food Chemistry*, *250*, 148-154.
- La Marca, M., Pucci, L., Bollini, R., Russo, R., Sparvoli, F., Gabriele, M. y Longo, V. (2015). Antioxidant effect of a fermented powder of Lady Joy bean in primary rat hepatocytes. *Cellular and Molecular Biology Letters*, *20*, 102-116.
- Lai, Y.-S., Hsu, W.-H., Huang, J.-J., & Wu, S.-C. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory effects of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) extracts on hydrogen peroxide- and lipopolysaccharide-treated RAW264.7 macrophages. *Food and Function*, *3*, 1294-1301.
- Lammi, C., Zanoni, C., Ferruzza, S., Ranaldi, G., Sambuy, Y. y Arnoldi, A. (2016). Hypocholesterolaemic activity of lupin peptides: Investigation on the crosstalk between human enterocytes and hepatocytes using a co-culture system including Caco-2 and HepG2 cells. *Nutrients*, *8*, 437.
- Landete, J. M., Hernández, T., Robredo, S., Dueñas, M., de la Rivas, B., Estrella, I. y Muñoz, R. (2015). Effect of soaking and fermentation on content of phenolic compounds of soybean (*Glycine max* cv. Merit) and mung beans (*Vigna radiata* [L] Wilczek). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *66*, 203-209.
- Latocha, P. (2017). The nutritional and health benefits of kiwiberry (*Actinidia arguta*) - A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, *72*, 325-334.
- Lee, B. H., Rose, D. R., Lin, A. H. M., Quezada-Calvillo, R., Nichols, B. L. y Hamaker, B. R. (2016). Contribution of the individual small intestinal  $\alpha$ -glucosidases to digestion of unusual  $\alpha$ -linked glycemic disaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*, 6487-6494.
- Lee, S. Y. y Hur, S. J. (2017). Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. *Food Chemistry*, *228*, 506-517.
- Li, H. y Aluko, R. E. (2010). Identification and inhibitory properties of multifunctional peptides from pea protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 11471-11476.
- Li, Y. W., Li, B., He, J. y Qian, P. (2011). Structure-activity relationship study of antioxidative peptides by QSAR modeling: The amino acid next to C-terminus affects the activity. *Journal of Peptide Science*, *17*, 454-462.
- Li, N., Taylor, L. S., Ferruzzi, M. G. y Mauer, L. J. (2012). Kinetic study of catechin stability: Effects of pH, concentration, and temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 12531-12539.

- Li, Y.-W. y Li, B. (2013). Characterization of structure–antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: Key sequence positions and their amino acid properties. *Journal of Theoretical Biology*, 318, 29-43.
- Li, X., Chen, F., Li, S., Jia, J., Gu, H. y Yang, L. (2016). An efficient homogenate-microwave-assisted extraction of flavonols and anthocyanins from blackcurrant marc: Optimization using combination of Plackett-Burman desing and Box-Behnken desing. *Industrial Crops and Products*, 94, 834-847.
- Limón, R. I., Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C. y Frias, J. (2014). Role of elicitation on the health-promoting properties of kidney bean sprouts. *LWT – Food Science and Technology*, 56, 328-334.
- Limón, R. I., Peñas, E., Torino, M. I., Martínez-Villaluenga, C., Dueñas, M. y Frias, J. (2015). Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extracts. *Food Chemistry*, 172, 343-352.
- Liu, M., Bayjanov, J. R., Renckens, B., Nauta, A. y Siezen, R. J. (2010). The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: A genomic comparison. *BMC Genomics*, 11, 36.
- Liu, C., Fang, L., Min, W., Liu, J. y Li, H. (2018). Exploration of the molecular interactions between angiotensin-I-converting enzyme (ACE) and the inhibitory peptides derived from hazelnut (*Corylus heterophylla* Fich.). *Food Chemistry*, 245, 471-480.
- López, A., El-Naggar, T., Dueñas, M., Ortega, T., Estrella, I., Hernández, T., Gómez-Serranillos, M. P., Palomino, O. M. y Carretero, M. E. (2017). Influence of processing in the phenolic composition and health-promoting properties of lentils (*Lens culinaris* L.). *Journal of Food Processing and Preservation*, 41, e13113. DOI: 10.1111/jfpp.13113.
- López-Barrios, L., Antunes-Ricardo, M. y Gutiérrez-Urbe, J. A. (2016). Changes in antioxidant and antiinflammatory activity of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates due to germination and enzymatic digestion. *Food Chemistry*, 203, 417-424.
- Lopez-Huertas, E. (2012). The effect of EPA and DHA on metabolic syndrome patients: a systematic review of randomised controlled trials. *British Journal of Nutrition*, 107, S185-S194.
- Luna-Vital, D. A., González De Mejía, E., Mendoza, S. y Loarca-Piña, G. (2015). Peptides present in the non-digestible fraction of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) inhibit the angiotensin-I converting enzyme by interacting with its catalytic cavity independent of their antioxidant capacity. *Food and Function*, 6, 1470-1479.
- Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Gaytán-Martínez, M., Preciado-Ortiz, R., Mendoza, S. y Loarca-Piña, G. (2017). Bioaccessibility and antioxidant activity of free phenolic compounds and oligosaccharides from corn (*Zea mays* L.) and common bean

- (*Phaseolus vulgaris* L.) chips during *in vitro* gastrointestinal digestion and simulated colonic fermentation. *Food Research International*, *100*, 304-311.
- Lv, H., Liu, Q., Zhou, J., Tan, G., Deng, X. y Ci, X. (2017). Daphnetin-mediated Nrf2 antioxidant signaling pathways ameliorate tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)-induced mitochondrial dysfunction and cell death. *Free Radical Biology y Medicine*, *106*, 38-52.
- Mamilla, R. K. y Mishra, V. K. (2017). Effect of germination on antioxidant and ACE inhibitory activities of legumes. *LWT – Food Science an Technology*, *75*, 51-58.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. y Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *81*, S230-S242.
- Martín-Cabrejas, M. A., Aguilera, Y., Pedrosa, M. M., Cuadrado, C., Hernández, T., Díaz, S. y Esteban, R. M. (2009). The impact of dehydration process on antinutrients and protein digestibility of some legume flours. *Food Chemistry*, *114*, 1063-1068.
- Martínez, R., López-Jurado, M., Wanden-Berghe, C., Sanz-Valero, J., Porres, J. M. y Kapravelou, G. (2016). Beneficial effects of legumes on parameters of the metabolic syndrome: a systematic review of trials in animal models. *British Journal of Nutrition*, *116*, 402-424.
- Martinez, R., Kapravelou, G., Donaire, A., Lopez-Chaves, C., Arrebola, F., Galisteo, M., Cantarero, S., Aranda, P., Porres, J. M. y Lopez-Jurado, M. (2018). Effects of a combined intervention with a lentil protein hydrolysate and a mixed training protocol on the lipid metabolism and hepatic markers of NAFLD in Zucker rats. *Food and Function*, *9*, 830-850.
- Martínez-Larrad, M. T., Corbatón-Anchuelo, A., Fernández-Pérez, C., Lazcano-Redondo, Y., Escobar-Jiménez, F. y Serrano-Ríos, M. (2016). Metabolic syndrome, glucose tolerance categories and the cardiovascular risk in Spanish population. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *114*, 23-31.
- Martins, S., Aguilar Cristóbal, N., Garza-Rodriguez Iliana de, I., Mussatto Solange, I. y Teixeira José, A. (2010). Kinetic study of nordihydroguaiaretic acid recovery from *Larrea tridentata* by microwave-assisted extraction. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *85*, 1142-1147.
- Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N. y Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, *29*, 365-373.
- Mayr, H. L., Tierney, A. C., Thomas, C. J., Ruiz-Canela, M., Radcliffe, J. y Itsiopoulos, C. (2018). Mediterranean-type diets and inflammatory markers in patients with coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition Research*, *50*, 10-24.

- McCracken, E., Monaghan, M. y Sreenivasan, S. (2018). Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in Dermatology*, 36, 14-20.
- Meeprom, A., Sompong, W., Suwannaphet, W., Yibchok-anun, S. y Adisakwattana, S. (2011). Grape seed extract supplementation prevents high-fructose diet-induced insulin resistance in rats by improving insulin and adiponectin signalling pathways. *British Journal of Nutrition*, 106, 1173-1181.
- Micha, R., Shulkin, M. L., Peñalvo, J. L., Khatibzadeh, S., Singh, G. M., Rao, M., Fahimi, S., Powles, J. y Mozaffarian, D. (2017). Etiologic effects and optimal intakes of foods and nutrients for risk of cardiovascular diseases and diabetes: Systematic reviews and meta-analyses from the nutrition and chronic diseases expert group (NutriCoDE). *PLoS ONE*, 12, e0175149. DOI: 10.1371/journal.pone.0175149.
- Miglani, N. y Bains, K. (2017). Interplay between proteins and metabolic syndrome—A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 2483-2496.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Menard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W. y Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. *Food and Function*, 5, 1113-1124.
- Mojica, L. y de Mejía, E. G. (2015). Characterization and comparison of protein and peptide profiles and their biological activities of improved common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mexico and Brazil. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70, 105-112.
- Mojica, L., Luna-Vital, D. A. y González de Mejía, E. (2017). Characterization of peptides from common bean protein isolates and their potential to inhibit markers of type-2 diabetes, hypertension and oxidative stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 2401-2410.
- Mollard, R. C., Luhovyy, B. L., Panahi, S., Nunez, M., Hanley, A. y Anderson, G. H. (2012). Regular consumption of pulses for 8 weeks reduces metabolic syndrome risk factors in overweight and obese adults. *British Journal of Nutrition*, 108, S111-S122.
- Muñoz, R., de las Rivas, B., López de Felipe, F., Reverón, I., Santamaría, L., Esteban-Torres, M., Curiel, J. A., Rodríguez, H. y Landete, J. M. (2016). Biotransformation of phenolics by *Lactobacillus plantarum* in fermented foods. In *Fermented foods in health and disease Prevention*. J. Frías, C. Martínez-Villaluenga, E. Peñas (Eds). *Academic Press*, pp. 63-83.
- Muñoz-Contreras, A. M., Bedoya-Berrío, G. y Velásquez, R. C. M. (2013). An approach to the etiology of metabolic syndrome. *Colombia Medica*, 44, 61-67.

- Muzolf, M., Szymusiak, H., Gliszczynska-Swiglo, A., Rietjens, I. M. C. M. y Tyrakowska, B. E. (2008). pH-dependent radical scavenging capacity of green tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 816-823.
- Nguyen, T., Nioi, P. y Pickett, C. B. (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(20), 13291-13295.
- Nguyen, N. T., Nguyen, X. M. T., Lane, J. y Wang, P. (2011). Relationship between obesity and diabetes in a US adult population: Findings from the national health and nutrition examination survey, 1999-2006. *Obesity Surgery*, *21*, 351-355.
- Nilsson, A., Johansson, E., Ekström, L. y Björck, I. (2013). Effects of a brown beans evening meal on metabolic risk markers and appetite regulating hormones at a subsequent standardized breakfast: A randomized cross-over study. *PLoS ONE*, *8*(4), e59985. DOI: 10.1371/journal.pone.0059985.
- Nishi, T., Hara, H., Asano, K. y Tomita, F. (2003). The soybean  $\beta$ -conglycinin  $\beta$  51-63 fragment suppresses appetite by stimulating cholecystokinin release in rats. *The Journal of Nutrition*, *133*, 2537-2542.
- Nishimura, H. (2017) Renin-angiotensin system in vertebrates: Phylogenetic view of structure and function. *Anatomical Science International*, *92*, 215-247.
- Niture, S. K., Khatri, R. y Jaiswal, A. K. (2014). Regulation of Nrf2-an update. *Free Radical Biology and Medicine*, *66*, 36-44.
- Nongonierma, A. B., Maux, S. L., Esteveny, C. y FitzGerald, R. J. (2017). Response surface methodology applied to the generation of casein hydrolysates with antioxidant and dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*, 1093-1101.
- Ogden, C. L., Carroll, M. D., Kit, B. K. y Flegal, K. M. (2014). Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. *Journal of the American Medical Association*, *311*, 806-814.
- Oomah, B. D., Caspar, F., Malcolmson, L. J. y Bellido, A.-S. (2011). Phenolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls. *Food Research International*, *44*, 436-441.
- Orqueda, M. E., Zampini, I. C., Torres, S., Alberto, M. R., Pino Ramos, L. L., Schmeda-Hirschmann, G., & Isla, M. I. (2017). Chemical and functional characterization of skin, pulp and seed powder from the Argentine native fruit mistol (*Ziziphus mistol*). Effects of phenolic fractions on key enzymes involved in metabolic syndrome and oxidative stress. *Journal of Functional Foods*, *37*, 531-540.

- 
- Orsini Delgado, M. C., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Añón, M. C. y Tironi, V. A. (2016). Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chemistry*, *197*, 1160-1167.
- Oseguera-Toledo, M. E., Gonzalez de Mejia, E., Dia, V. P. y Amaya-Llano, S. L. (2011). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF-kappa B pathways. *Food Chemistry*, *127*, 1175-1185.
- Oseguera-Toledo, M. E., Gonzalez de Mejia, E. y Amaya-Llano, S. L. (2015). Hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins hydrolyzed by alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress. *Food Research International*, *76*, 839-851.
- Oseguera Toledo, M. E., Gonzalez de Mejia, E., Sivaguru, M., y Amaya-Llano, S. L. (2016). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein-derived peptides increased insulin secretion, inhibited lipid accumulation, increased glucose uptake and reduced the phosphatase and tensin homologue activation *in vitro*. *Journal of Functional Foods*, *27*, 160-177.
- Othman, N. B., Roblain, D., Chammen, N., Thonart, P. y Hamdi, M. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry*, *116*, 662-669.
- Ozga, J., Lopes-Lutz, D., Schieber, A. y Reinecke, D. M. (2012). Characterization of proanthocyanidins in pea (*Pisum sativum* L.), lentil (*Lens culinaris* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.) seeds. *Food Research International*, *46*, 528-535.
- Padhi, E. M. T. y Ramdath, D. D. (2017). A review of the relationship between pulse consumption and reduction of cardiovascular disease risk factors. *Journal of Functional Foods*, *38*, 635-643.
- Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F. y González-Aguilar, G. A. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, *76*, R6-R15.
- Paucar-Menacho, L. M., Peñas, E., Dueñas, M., Frias, J. y Martínez-Villaluenga, C. (2017a). Optimizing germination conditions to enhance the accumulation of bioactive compounds and the antioxidant activity of kiwicha (*Amaranthus caudatus*) using response surface methodology. *LWT – Food Science and Technology*, *76*, 245-252.
- Paucar-Menacho, L. M., Martínez-Villaluenga, C., Dueñas, M., Frias, J. y Peñas, E. (2017b). Response surface optimisation of germination conditions to improve the accumulation

- of bioactive compounds and the antioxidant activity in quinoa. *International Journal of Food Science and Technology*, *53*, 516-524.
- Pellegrini, M., Lucas-Gonzalez, R., Fernández-López, J., Ricci, A., Pérez-Álvarez, J. A., Sterzo, C. L. y Viuda-Martos, M. (2017). Bioaccessibility of polyphenolic compounds of six quinoa seeds during *in vitro* gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, *38*, 77-88.
- Pelvan, E., Olgun, E. Ö., Karadağ, A. y Alasalvar, C. (2018). Phenolic profiles and antioxidant activity of Turkish Tombul hazelnut samples (natural, roasted, and roasted hazelnut skin). *Food Chemistry*, *244*, 102-108.
- Peng, C.-H., Liu, L.-K., Chuang, C.-M., Chyau, C.-C., Huang, C.-N. y Wang, C.-J. (2011). Mulberry water extracts possess an anti-obesity effect and ability to inhibit hepatic lipogenesis and promote lipolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 2663-2671.
- Peng, X., Zhang, G., Liao, Y. y Gong, D. (2016). Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on  $\alpha$ -glucosidase. *Food Chemistry*, *190*, 207-215.
- Pfeuffer, M., Auinger, A., Bley, U., Kraus-Stojanowic, I., Laue, C., Winkler, P., Rüfer, C. E., Frank, J., Bösch-Saadatmandi, C., Rimbach, G. y Schrezenmeir, J. (2013). Effect of quercetin on traits of the metabolic syndrome, endothelial function and inflammation in men with different APOE isoforms. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *23*, 403-409.
- Piñol, C., Alegría, E. y Langham, S. (2011). Carga epidemiológica y económica de la hipertensión arterial en pacientes con síndrome metabólico en España: un modelo basado en la prevalencia. *Hipertensión y Riesgo Vascular*, *28*, 126-136.
- Pistollato, F. y Battino, M. (2014). Role of plant-based diets in the prevention and regression of metabolic syndrome and neurodegenerative diseases. *Trends in Food Science and Technology*, *40*, 62-81.
- Podsędek, A., Redzynia, M., Klewicka, E. y Koziolkiewicz, M. (2014). Matrix effects on the stability and antioxidant activity of red cabbage anthocyanins under simulated gastrointestinal digestion. *BioMed Research International*, *2014*, 365738. DOI: 10.1155/2014/365738.
- Pradeep, P. M. y Sreerama, Y. N. (2018). Phenolic antioxidants of foxtail and little millet cultivars and their inhibitory effects on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities. *Food Chemistry*, *247*, 46-55.
- Prakash, D. y Gupta, C. (2011). Role of phytoestrogens as nutraceuticals in human health: A review. *BioTechnology: An Indian Journal*, *5*, 171-178.
- Quesada, H., del Bas, J. M., Pajuelo, D., Díaz, S., Fernandez-Larrea, J., Pinent, M., Arola, L., Salvadó, M. J. y Bladé, C. (2009). Grape seed proanthocyanidins correct dyslipidemia

- associated with a high-fat diet in rats and repress genes controlling lipogenesis and VLDL assembling in liver. *International Journal of Obesity*, 33, 1007-1012.
- Rains, T. M., Agarwal, S. y Maki, K. C. (2011). Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22, 1-7.
- Ramachandran, V. y Saravanan, R. (2013). Asiatic acid prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Functional Foods*, 5, 1077-1087.
- Ramesh, V., Kumar, R., Singh, R. R. B., Kaushik, J. K. y Mann, B. (2012). Comparative evaluation of selected strains of lactobacilli for the development of antioxidant activity in milk. *Dairy Science and Technology*, 92, 179-188.
- Reverri, E. J., Randolph, J. M., Steinberg, F. M., Tissa Kappagoda, C., Edirisinghe, I. y Burton-Freeman, B. M. (2015). Black beans, fiber, and antioxidant capacity pilot study: Examination of whole foods vs. functional components on postprandial metabolic, oxidative stress, and inflammation in adults with metabolic syndrome. *Nutrients*, 7, 6139-6154.
- Reverri, E. J., Randolph, J. M., Kappagoda, C. T., Park, E., Edirisinghe, I. y Burton-Freeman, B. M. (2017). Assessing beans as a source of intrinsic fiber on satiety in men and women with metabolic syndrome. *Appetite*, 118, 75-81.
- Rizzello, C. G., Cassone, A., Di Cagno, R. y Gobbetti, M. (2008). Synthesis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) during sourdough fermentation by selected lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6936-6943.
- Rizzello, C. G., Hernández-Ledesma, B., Fernández-Tomé, S., Curiel, J. A., Pinto, D., Marzani, B., Coda, R. y Gobbetti, M. (2015). Italian legumes: Effect of sourdough fermentation on lunasin-like polypeptides. *Microbial Cell Factories*, 14, 168.
- Rizzello, C. G., Tagliacruzchi, D., Babini, E., Sefora Rutella, G., Taneyo Saa, D. L. y Gianotti, A. (2016). Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *Journal of Functional Foods*, 27, 549-569.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866-2887.
- Rodríguez-Monforte, M., Sánchez, E., Barrio, F., Costa, B. y Flores-Mateo, G. (2017). Metabolic syndrome and dietary patterns: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *European Journal of Nutrition*, 56, 925-947.
- Rossmeslova, L., Malisova, L., Kracmerova, J. y Stich, V. (2013). Adaptation of human adipose tissue to hypocaloric diet. *International Journal of Obesity*, 37, 640-650.

- Santhekadur, P. K., Kumar, D. P., Seneshaw, M., Mirshahi, F. y Sanyal, A. J. (2017). The multifaceted role of natriuretic peptides in metabolic syndrome. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *92*, 826-835.
- Scholze, J., Alegria, E., Ferri, C., Langham, S., Stevens, W., Jeffries, D. y Uhl-Hochgraeber, K. (2010). Epidemiological and economic burden of metabolic syndrome and its consequences in patients with hypertension in Germany, Spain and Italy; a prevalence-based model. *BMC Public Health*, *10*, 529.
- Sengul, H., Surek, E. y Nilufer-Erdil, D. (2014). Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an *in-vitro* gastrointestinal digestion model. *Food Research International*, *62*, 1069-1079.
- Sestelo, A. B. F., Poza, M. y Villa, T. G. (2004).  $\beta$ -glucosidase activity in a *Lactobacillus plantarum* wine strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *20*, 633-637.
- Sharma, J. N., Al-Omran, A. y Parvathy, S. S. (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, *15*, 252-259.
- Shen, J., Wilmot, K. A., Ghasemzadeh, N., Molloy, D. L., Burkman, G., Mekonnen, G., Gongora, M. C., Quyyumi, A. A. y Sperling, L. S. (2015). Mediterranean dietary patterns and cardiovascular health. *Annual Review of Nutrition*, *35*, 425-449.
- Shimizu, M., Tsunogai, M. y Arai, S. (1997). Transepithelial transport of oligopeptides in the human intestinal cell, Caco-2. *Peptides*, *18*, 681-687.
- Sienkiewicz-Szłapka, E., Jarmołowska, B., Krawczuk, S., Kostyra, E., Kostyra, H. y Bielikowicz, K. (2009). Transport of bovine milk-derived opioid peptides across a Caco-2 monolayer. *International Dairy Journal*, *19*, 252-257.
- Simsek, M., Quezada-Calvillo, R., Ferruzzi, M. G., Nichols, B. L. y Hamaker, B. R. (2015). Dietary phenolic compounds selectively inhibit the individual subunits of maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase with the potential of modulating glucose release. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 3873-3879.
- Simsek, M., Quezada-Calvillo, R., Nichols, B. L. y Hamaker, B. R. (2017). Phenolic compounds increase the transcription of mouse intestinal maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase. *Food and Function*, *8*, 1915-1924.
- Singh, B. P., Vij, S. y Hati, S. (2014). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, *54*, 171-179.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A. y Singh, N. (2017). Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. *Food Research International*, *101*, 1-16.

- Singh, B. P. y Vij, S. (2017). Growth and bioactive peptides production potential of *Lactobacillus plantarum* strain C2 in soy milk: A LC-MS/MS based revelation for peptides biofunctionality. *LWT - Food Science and Technology*, 86, 293-301.
- Singh nee' Nigam, P. (2009). Production of bioactive secondary metabolites. In biotechnology for agro-Industrial residues utilisation: Utilisation of agro-residues. P. Singh nee' Nigam y A. Pandey (Eds.). *Springer Netherlands*, pp. 129-145.
- Singh nee' Nigam, P. y Pandey, A. (2009). Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. In Botechnology for agro-industrial residues utilisation: Utilisation of agro-residues. P. Singh nee' Nigam y A. Pandey (Eds.). *Springer Netherlands*, pp. 197-221.
- Şöhretoğlu, D., Sari, S., Soral, M., Barut, B., Özel, A. y Liptaj, T. (2018). Potential of *Potentilla inclinata* and its polyphenolic compounds in  $\alpha$ -glucosidase inhibition: Kinetics and interaction mechanism merged with docking simulations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 81-87.
- Spanou, C. I., Veskokouk, A. S., Stagos, D., Liadaki, K., Aligiannis, N., Angelis, A., Skaltsounis, A.-L., Anastasiadi, M., Haroutounian, S. A. y Kouretas, D. (2012). Effects of Greek legume plant extracts on xanthine oxidase, catalase and superoxide dismutase activities. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 68, 37-45.
- Staljanssens, D., Van Camp, J., Billiet, A., De Meyer, T., Al Shukor, N., De Vos, W. H. y Smagghe, G. (2012). Screening of soy and milk protein hydrolysates for their ability to activate the CCK1 receptor. *Peptides*, 34, 226-231.
- Starzyńska-Janiszewska, A., Stodolak, B. y Mickowska, B. (2014). Effect of controlled lactic acid fermentation on selected bioactive and nutritional parameters of tempeh obtained from unhulled common bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 359-366.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D. y Conte, A. (2010). *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120, 599-606.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E. y Conte, A. (2011). The first tract of alimentary canal as an extractor. Release of phytochemicals from solid food matrices during simulated digestion. *Journal of Food Biochemistry*, 36, 555-568.
- Takeoka, G. R., Dao, L. T., Tamura, H. y Harden, L. A. (2005). Delphinidin 3-O-(2-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl- $\alpha$ -L-arabinopyranoside): A novel anthocyanin identified in Beluga black lentils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4932-4937.

- Tan, Y. y Chang, S. K. C. (2017). Digestive enzyme inhibition activity of the phenolic substances in selected fruits, vegetables and tea as compared to black legumes. *Journal of Functional Foods*, 38, 644-655.
- Tan, Y., Chang, S. K. C. y Zhang, Y. (2017). Comparison of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera. *Food Chemistry*, 214, 259-268.
- Thomas, D. y Elliott, E. J. (2009). Low glycaemic index, or low glycaemic load, diets for diabetes mellitus. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1, CD006296. DOI: 10.1002/14651858.CD006296.pub2.
- Tian, M., Fang, B., Jiang, L., Guo, H., Cui, J. y Ren, F. (2015). Structure-activity relationship of a series of antioxidant tripeptides derived from  $\beta$ -Lactoglobulin using QSAR modeling. *Dairy Science and Technology*, 95, 451-463.
- Torino, M. I., Limón, R. I., Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C. y Frias, J. (2013). Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry*, 136, 1030-1037.
- Trinidad, T. P., Mallillin, A. C., Loyola, A. S., Sagum, R. S. y Encabo, R. R. (2009). The potential health benefits of legumes as a good source of dietary fibre. *British Journal of Nutrition*, 103, 569-574.
- Tzeng, Y.-M., Chen, K., Rao, Y. K. y Lee, M.-J. (2009). Kaempferitrin activates the insulin signaling pathway and stimulates secretion of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. *European Journal of Pharmacology*, 607, 27-34.
- Velderrain-Rodriguez, G. R., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J. F., Chen, C. Y. O., Robles-Sanchez, M., Astiazaran-Garcia, H., Alvarez-Parrilla, E. y Gonzalez-Aguilar, G. A. (2014). Phenolic compounds: their journey after intake. *Food and Function*, 5, 189-197.
- Wing, R. R., Lang, W., Wadden, T. A., Safford, M., Knowler, W. C., Bertoni, A. G., Hill, J. O., Brancati, F. L., Peters, A. y Wagenknecht, L. (2011). Benefits of modest weight loss in improving cardiovascular risk factors in overweight and obese individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 34, 1481-1486.
- Xu, B. J. y Chang, S. K. C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72, S159-S166.
- Xu, B. y Chang, S. K. C. (2010). Phenolic substance characterization and chemical and cell-based antioxidant activities of 11 lentils grown in the northern United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1509-1517.

- Xu, M., Jin, Z., Peckrul, A. y Chen, B. (2018). Pulse seed germination improves antioxidative activity of phenolic compounds in stripped soybean oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 250, 140-147.
- Xuan, C. L., Tao, F. R., Guo, L. R., Liu, Q., Chang, S. K., Liu, K. X. y Sun, C. W. (2013). Comparison of extracts from cooked and raw lentil in antagonizing angiotensin II-induced hypertension and cardiac hypertrophy. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17, 2644-2653.
- Yang, R., Li, X., Lin, S., Zhang, Z. y Chen, F. (2017). Identification of novel peptides from 3 to 10 kDa pine nut (*Pinus koraiensis*) meal protein, with an exploration of the relationship between their antioxidant activities and secondary structure. *Food Chemistry*, 219, 311-320.
- Yao, Y., Cheng, X., Wang, L., Wang, S. y Ren, G. (2011). Biological potential of sixteen legumes in China. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 7048-7058.
- Yao, F., Sun, C. y Chang, S. K. C. (2012). Lentil polyphenol extract prevents angiotensin II-induced hypertension, vascular remodelling and perivascular fibrosis. *Food and Function*, 3, 127-133.
- Yea, C. S., Ebrahimpour, A., Hamid, A. A., Bakar, J., Muhammad, K. y Saari, N. (2014). Winged bean [*Psophorcarpus tetragonolobus* (L.) DC] seeds as an underutilised plant source of bifunctional proteolysate and biopeptides. *Food and Function*, 5, 1007-1016.
- Yuk-Young, L., Hong-Gyum, K., Haeng-Im, J., Youn Hee, S., Sung Min, H. y Eun-Hee, P. (2002). Activities of antioxidant and redox enzymes in human normal hepatic and hepatoma cell lines. *Molecules and Cells*, 14, 305-311.
- Zhang, B., Deng, Z., Ramdath, D. D., Tang, Y., Chen, P. X., Liu, R., Liu, Q. y Tsao, R. (2015). Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chemistry*, 172, 862-872.
- Zhang, B., Deng, Z., Tang, Y., Chen, P. X., Liu, R., Dan Ramdath, D., Liu, Q., Hernandez, M. y Tsao, R. (2017a). Bioaccessibility, in vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolics in cooked green lentil (*Lens culinaris*). *Journal of Functional Foods*, 32, 248-255.
- Zhang, Y. T., Yu, B., Lu, Y. H., Wang, J., Liang, J. B., Tufarelli, V., Laudadio, V. y Liao, X. D. (2017b). Optimization of the fermentation conditions to reduce anti-nutritive factors in soybean meal. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41, e13114. DOI: 10.1111/jfpp.13114.

- Zhang, X. T., Sun, X. Q., Wu, C., Chen, J. L., Yuan, J. J., Pang, Q. F. y Wang, Z. P. (2018). Heme oxygenase-1 induction by methylene blue protects RAW264.7 cells from hydrogen peroxide-induced injury. *Biochemical Pharmacology*, 148, 265-277.
- Zhu, Q. Y., Holt, R. R., Lazarus, S. A., Ensunsa, J. L., Hammerstone, J. F., Schmitz, H. H. y Keen, C. L. (2002). Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from Cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1700-1705.
- Zou, Y., Chang, S. K. C., Gu, Y. y Qian, S. Y. (2011). Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. Morton) extract and its fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2268-2276.

#### **BIBLIOGRAFÍA ELECTRÓNICA**

<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/nutrients/index>

<http://www.uwm.edu.pl/biochemia>

[http://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy\\_spanish\\_web.pdf](http://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy_spanish_web.pdf)

<http://www.chem.gmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/>