

# IMPROVEMENT NUTRITIONAL/ANTIOXIDANT PROPERTIES OF UNDERUTILIZED LEGUME TEPARY BEAN (*Phaseolus acutifolius*) BY SOLID STATE FERMENTATION

## MEJORAMIENTO DE LAS PROPIEDADES NUTRICIONALES Y ANTIOXIDANTES DE LA LEGUMINOSA FRIJOL TÉPARI (*Phaseolus acutifolius*) SUBUTILIZADA MEDIANTE FERMENTACIÓN DE ESTADO SÓLIDO

Coralia Mora-Uzeta<sup>1</sup>, Edith O. Cuevas-Rodríguez<sup>1,2</sup>, Jaime López-Cervantes<sup>3</sup>, Jorge Milán-Carrillo<sup>1,2</sup>  
Roberto Gutiérrez-Dorado<sup>1,2</sup>, Cuauhtémoc Reyes-Moreno<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB), Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), Ciudad Universitaria, C. P. 80 000. Culiacán, Sinaloa, México. <sup>2</sup>Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, FCQB-UAS, Ciudad Universitaria, C. P. 80 000 Culiacán, Sinaloa, México. (creyes@uas.edu.mx). <sup>3</sup>Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON).

### ABSTRACT

The objective of this study was to optimize the solid state fermentation (SSF) process of tepary bean seeds to identify optimal fermentation temperature (FT) and time (Ft) to maximize protein content (PC), antioxidant activity (AoxA), and total phenolic content (TPC) of fermented tepary bean seeds. Response surface methodology was applied to PC, AoxA, and TPC. The experimental design was central composite rotatable with two factors [Fermentation temperature (FT=20-40 °C)/Fermentation time (Ft=06-108 h)] and five levels (13 treatments). Before fermentation the seeds were soaked (25 °C 8 h<sup>-1</sup>) in acetic acid solution (pH=3), drained, and their seed coats removed manually. Seed coats were dried, milled, packed and stored. The cotyledons were cooked in acetic acid solution (pH=3; 90 °C 30 min<sup>-1</sup>), cooled, and inoculated (*Rhizopus oligosporus*). The resulting bioprocessed cotyledons were milled and blended with their corresponding milled seed coats to obtain fermented tepary bean flours (FTBF). Regression models for the prediction of PC, AoxA, and TPC in FTBF were also obtained; maximum values for this response variables were attained at FT=37.6 °C and Ft=96.2 h. The SSF bioprocess increased PC (+35%), *in vitro* protein digestability (+17.54%), calculated-protein efficiency ratio (+32.37%), AoxA (ORAC: +117%, ABTS: +88.7%), and TPC (+196.7%) of tepary bean seeds. The SSF is an effective strategy to increase the TPC of tepary bean seeds for enhancing functionality with improved antioxidant activity.

### RESUMEN

El objetivo de este estudio fue optimizar el proceso de fermentación en estado sólido (SSF) de semillas de frijol tépari para identificar la temperatura (FT) y el tiempo de fermentación (Ft) óptimos para maximizar el contenido de proteína (PC), la actividad antioxidante (AoxA) y el contenido de fenólicos total (TPC) de las semillas de frijol tépari fermentadas. La metodología de superficie de respuesta se aplicó al PC, la AoxA y el TPC. El diseño experimental fue compuesto central rotatable con dos factores [Temperatura de fermentación (FT=20-40 °C)/Tiempo de fermentación (Ft=6-108 h)] y cinco niveles (13 tratamientos). Antes de la fermentación, remojo las semillas (25 °C 8 h<sup>-1</sup>) en una solución de ácido acético (pH=3), las escurrimos y retiramos de forma manual las cáscaras de las semillas. Después, secamos, molimos, empacamos y almacenamos las cáscaras. Los cotiledones los cocimos en una solución de ácido acético (pH=3; 90 °C 30 min<sup>-1</sup>), los enfriamos e inoculamos con *Rhizopus oligosporus*. Los cotiledones bioprocados los molimos y los mezclamos con sus cáscaras correspondientes para obtener harinas de frijol tépari fermentado (FTBF). También obtuvimos modelos de regresión para predecir el PC, la AoxA y el TPC en la FTBF; los valores máximos de estas variables de respuesta se obtuvieron a una FT=37.6 °C y a un Ft=96.2 h. El bioproceso de SSF aumentó el PC (+35%), la digestibilidad proteínica *in vitro* (+17.54%), la relación de eficiencia proteínica calculada (+32.37%), la AoxA (ORAC: +117%, ABTS: +88.7%) y el TPC (+196.7%) de las semillas de frijol tépari. La SSF es una estrategia efectiva para aumentar el TPC de las semillas de frijol tépari y así incrementar la funcionalidad con actividad antioxidante mejorada.

\*Author for correspondence ❖ Autor responsable

Received: April, 2018. Approved: July, 2018.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 53: 987-1003. 2019.

**Palabras clave:** frijol tépari, *Phaseolus acutifolius*, actividad antioxidante, fermentación en estado sólido, optimización.

**Keywords:** tepary bean, *Phaseolus acutifolius*, antioxidant activity, solid state fermentation, optimization.

## INTRODUCTION

Legume seeds contain 16-50% protein and provide one-third of all dietary protein nitrogen. Therefore, legumes in combination with cereals provide one of the best solutions to protein calorie malnutrition, especially in the developing countries. These are also an important source of the 15 essential minerals needed by humans (Sing and Patap, 2016). Dietary antioxidants may play an important role in protecting the cell against damage caused by free radicals, in that they act as radical scavengers, reducing agents, potential complexes of prooxidant metals and quenchers for singlet oxygen formation (Doblado *et al.*, 2007). Legumes contain many phenolic compounds, which are natural antioxidants and represent an important group of bioactive compounds in foods. They are associated with reducing the risks of hypertension, diabetes, heart disease, cancer, inhibition of plasma platelet aggregation, cyclo-oxygenase activity, histamine release, as well as *in vitro* antiviral, antibacterial, anti-allergenic, and anti-inflammatory activities. The benefits about several of these conditions come in part through the antioxidant characteristic of phenols (Cheng *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016).

The tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) is a short life cycle and drought resistant legume originally from the deserts and semi-arid environment of Northwestern Mexico and Southwestern United States. It is recognized for its low requirements of moisture with high adaptation to warm environments, *i.e.*, is heated tolerant and for its resistance to many diseases (Salgado *et al.*, 1994; Miklas and Stavely, 1998; López *et al.*, 2005). The main nutritional advantage of the tepary bean lies in the mature seeds which contain 21.0-31.9% protein, 0.9-1.17% fat and 65.3-69.1% carbohydrates (Scheerens *et al.*, 1983). Currently, tepary bean seeds are rarely consumed, and their high protein and carbohydrate content are underutilized.

Solid state fermentation (SSF) bioprocess is defined as the growth of microorganisms, often fungi, on the surface of a porous and moist solid substrate particle in which enough moisture is present to maintain microbial growth and metabolism. This process is carried out in absence or near-absence of visible liquid

## INTRODUCCIÓN

Las leguminosas contienen 16-50% de proteína y proporcionan un tercio del nitrógeno proteico de la dieta. Por lo tanto, las leguminosas, junto con los cereales, representan una de las mejores soluciones para la desnutrición proteica-calórica, especialmente en los países en desarrollo. Éstas también son una fuente importante de los 15 minerales requeridos por el humano (Singh and Pratap, 2016). Los antioxidantes de la dieta pueden tener una función importante para proteger las células del daño generado por los radicales libres mediante su capacidad de atrapar radicales libres, al actuar como eliminadores de radicales, agentes reductores, complejos potenciales de metales prooxidantes e inhibir la formación del oxígeno singlete (Doblado *et al.*, 2007). Las leguminosas contienen muchos compuestos fenólicos, los cuales son antioxidantes naturales y representan un grupo importante de compuestos bioactivos en los alimentos. Estos compuestos reducen los riesgos de hipertensión, diabetes, cardiopatías y cáncer, inhiben la agregación plaquetaria en plasma, la actividad de la ciclooxigenasa y la liberación de histamina; también presentan actividad antiviral, antibacterial, antialérgica y antiinflamatoria *in vitro*. Estos beneficios se deben, en parte, a la cualidad antioxidante de los fenoles (Cheng *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016).

El frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) es una leguminosa con un ciclo de vida corto y resistente a la sequía, originaria de ambientes desérticos y semiáridos del noroeste de México y el suroeste de Estados Unidos. Se le reconoce por su bajo requerimiento de humedad, su tolerancia al calor y su resistencia a muchas enfermedades (Salgado *et al.*, 1994; Miklas and Stavely, 1998; López *et al.*, 2005). La principal ventaja nutricional del frijol tépari está en las semillas maduras que contienen 21.0-31.9% de proteína, 0.9-1.17% de grasa y 65.3-69.1% de carbohidratos (Scheerens *et al.*, 1983). Ahora, el consumo de las semillas de frijol tépari es muy bajo, y su alto contenido de proteína y carbohidratos no se aprovecha.

El bioproceso de fermentación en estado sólido (SSF) se define como el crecimiento de microorganismos, en su mayoría hongos, en la superficie de un sustrato sólido poroso y húmedo, esta humedad es suficiente para mantener el crecimiento y metabolismo microbiano. Este proceso se realiza en la ausencia o casi ausencia de agua líquida visible entre

water between the particles. This condition favors the development of filamentous fungi, given their unique capacity to colonize the interparticular spaces of solid matrices (Díaz *et al.*, 2016). SSF is a simple and economical way to improve the nutritional value of grains by causing desirable changes in the nutrient availability, texture, organoleptic characteristics, and antioxidant and nutraceutical properties (Sánchez *et al.*, 2014; Rochín *et al.*, 2015).

Fermented foods represent on average one-third of total food consumption, especially fermented soybean, which is widespread in the world as a local food: Natto (Japan), Kinema (India), Tua-nao (Thailand), Tempeh (Indonesia). Those products have higher antioxidant activity via microbial fermentation due to the breakdown of the glycosylated forms and releasing the free aglycon (Bahaciu *et al.*, 2015). The microorganisms in fermented foods, *Rhizopus oligosporus*, and others filamentous fungus (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori*, *Rhizopus oryzae*) show high efficiency for improving water-soluble total phenolic content (TPC) and antioxidant properties of whole grain cereals: wheat, brown rice, maize, oat (Bhanja and Kuhad, 2014); besides, *R. oligosporus* is the main producing mold found in tempeh, a fermented product mainly obtained from soybean. This filamentous fungus is a GRAS (Generally Recognized as Safe) strain. SSF would increase the phenolic content and antioxidant activity of fungal processed seeds, which will enhance the potential health-relevant functionality of these foods (Madeira-Junior *et al.*, 2013; Bhanja and Kuhad, 2014). *Rhizopus oligosporus* inoculated over substrates (black soybean, chickpea, common beans) has significantly enhanced the content of total phenolic and antioxidant activity (Cheng *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2014; Rochín *et al.*, 2015). The improvement of antioxidant activity of fermented grains-based foods during the SSF is due to the increase of phenolic compounds and flavonoids carried out by fungi enzymatic hydrolysis (Hur *et al.*, 2014). The enzymes involved in the release of phenolic compounds depend on the microorganisms employed in the fermentation. These enzymes hydrolyze the ester bonds of the cell wall structure of grains, which link phenolic compounds and, as a consequence, the free phenolic compounds, as well as bound forms, are more available for their extraction. Among these enzymes,  $\beta$ -glucosidase is responsible for catalyzing the hydrolysis of  $\beta$  1-4 bounds in alkyl

las partículas. Esta condición favorece el desarrollo de hongos filamentosos, debido a su peculiar capacidad para colonizar los espacios entre las partículas de matrices sólidas (Díaz *et al.*, 2016). La SSF es un método simple y económico para mejorar el valor nutricional de los granos, porque causan cambios deseables en la disponibilidad de nutrientes, la textura, las características organolépticas y las propiedades antioxidantes y nutraceuticas (Sánchez *et al.*, 2014; Rochín *et al.*, 2015).

Los alimentos fermentados representan en promedio un tercio del consumo total de alimentos, en especial la soya fermentada, distribuida en el mundo como un alimento local: Natto (Japón), Kinema (India), Tua-nao (Tailandia), Tempe (Indonesia). Estos productos tienen una actividad antioxidante más elevada debido a la fermentación microbiana que desdobra las formas glucosiladas liberando agliconas (Bahaciu *et al.*, 2015). Los microorganismos en alimentos fermentados, como *Rhizopus oligosporus* y otros hongos filamentosos (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori*, *Rhizopus oryzae*) muestran alta eficiencia para mejorar el contenido de fenólicos total (TPC) soluble en agua y las propiedades antioxidantes de granos integrales de cereales: trigo, arroz integral, maíz, avena (Bhanja and Kuhad, 2014); además, *R. oligosporus* es el principal hongo encontrado en el tempe, un producto fermentado obtenido principalmente de soya. Este hongo filamentoso es una cepa GRAS (Generally Recognized as Safe [Generalmente Reconocida como Segura]). La SSF aumentaría el contenido fenólico y la actividad antioxidante de las semillas procesadas por hongos, lo cual incrementa la función potencial relacionada a la salud de estos alimentos (Madeira-Junior *et al.*, 2013; Bhanja and Kuhad, 2014). *Rhizopus oligosporus* inoculado en sustratos (soya negra, garbanzo, frijol común) aumenta significativamente el contenido de fenólicos total y la actividad antioxidante (Cheng *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2014; Rochín *et al.*, 2015). El aumento de la actividad antioxidante de los alimentos a base de semillas fermentadas mediante SSF se debe al incremento de los compuestos fenólicos y flavonoides realizado por la hidrólisis enzimática de los hongos (Hur *et al.*, 2014). Las enzimas involucradas en la liberación de compuestos fenólicos dependen de los microorganismos utilizados en la fermentación. Estas enzimas hidrolizan los enlaces éster de la pared celular de los granos, que unen a

and aryl- $\beta$ -d-glucosides to release phenolic aglycone fractions (Huynh *et al.*, 2014). These authors found that the activity of  $\beta$ -glucosidase increased with the fermentation time and resulted in the accumulation of phenolic aglycones.

There are studies about the effect of SSF on nutritional and nutraceutical value of legumes such as soybeans, common beans, and chickpeas. However, in the literature reviewed no research was found about the optimization of the SSF bioprocess to increase the antioxidant activity, total phenolic content, and nutritional value of underutilized legume tepary bean seeds.

Therefore, the objective of this study was to find the best solid state fermentation conditions of tepary bean seeds that would maximize the protein content, antioxidant activity, and total phenolic content, in order to obtain a functional flour with enhanced nutritional properties, and antioxidant potential.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Tepary bean seeds were purchased in local Rafael Buelna Market, Culiacán, Sinaloa, México. The tepary bean seeds were cleaned and stored in tightly sealed containers at 4 °C until use.

### Methods

#### Production of fermented tepary bean flours (FTBF)

A 200 g sample of tepary bean seeds was soaked in acetic acid solution (pH=3.0, 25 °C, 8 h). Tepary bean seed coats were removed manually, dried and milled. The bean cotyledons were cooked (90 °C 30 min<sup>-1</sup>) in acidified distilled water (pH=3.0), drained, cooled (25 °C, 3 h<sup>-1</sup>), inoculated with strain NRRL 2710 of *R. oligosporus* suspension (1×10<sup>6</sup> spores mL<sup>-1</sup>) and packed in perforated (each cm) plastic bags (15×15 cm). The SSF bioprocess was achieved by applying combinations of temperature/time in the intervals of 20-40 °C and 06-108 h, respectively (Table 1). The bioprocessed samples were dried (50 °C 8 h<sup>-1</sup>), cooled at room temperature (23±2 °C), and ground. The bioprocessed tepary bean cotyledons flour was added with its ground seed coats to obtain fermented tepary bean flours (FTBF). FTBF were packed and kept at 4 °C. Additionally, whole raw tepary bean seeds were ground (80-US mesh=0.180 mm) to obtain unprocessed tepary bean flour (UTBF), which was used as control.

los compuestos fenólicos y, como consecuencia, los compuestos fenólicos libres, al igual que las formas ligadas, están más disponibles para su extracción. Entre estas enzimas, la  $\beta$ -glucosidasa cataliza la hidrólisis de los enlaces  $\beta$  1-4 del alquil y aril- $\beta$ -d-glucósido para liberar las fracciones de aglicona fenólica (Huynh *et al.*, 2014). Estos autores encontraron que la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa aumentó con el tiempo de fermentación y causaba la acumulación de agliconas fenólicas.

Hay estudios del efecto de la SSF en el valor nutricional y nutracéutico de leguminosas como la soya, el frijol común y los garbanzos. Sin embargo, en la literatura consultada no encontramos información sobre la optimización del bioprocso de SSF para aumentar la actividad antioxidante, el contenido de fenólicos total y el valor nutricional de las semillas subutilizadas de frijol tépari.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue encontrar las condiciones óptimas de fermentación en estado sólido de las semillas de frijol tépari para maximizar el contenido de proteína, la actividad antioxidante y el contenido de fenólicos total, para así obtener una harina funcional con propiedades nutricionales mejoradas y potencial antioxidante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Las semillas de frijol tépari se compraron en el mercado local Rafael Buelna, Culiacán, Sinaloa, México. Las semillas se limpiaron y almacenaron en contenedores herméticamente cerrados a 4 °C hasta su uso.

### Métodos

#### Producción de harinas de frijol tépari fermentado (FTBF)

Una muestra de 200 g de semillas de frijol tépari se remojó en una solución de ácido acético (pH=3.0, 25 °C, 8 h). Las cáscaras de las semillas, se retiraron a mano, se secaron y molieron. Los cotiledones del frijol se cocieron (90 °C 30 min<sup>-1</sup>) en una solución de ácido acético (pH=3.0), se secaron y enfriaron (25 °C, 3 h<sup>-1</sup>), se inocularon con una suspensión (1×10<sup>6</sup> esporas mL<sup>-1</sup>) de la cepa NRRL 2710 de *R. oligosporus* y se empacaron en bolsas de plástico (15×15 cm) perforadas (cada cm). El bioprocso SSF se obtuvo al aplicar combinaciones de temperatura/tiempo en intervalos de 20-40 °C y de 6-108 h, respectivamente (Cuadro 1).

### Protein content

The official AOAC (1999) method 960.52 was used to determine protein (Nx6.25) content.

### Extraction of free and bound phenolic compounds

Free phenolic compounds were extracted according to Dewanto *et al.* (2002). One gram of dry ground sample was shaken in 10 mL of chilled ethanol-water (80:20, v/v) in a tube rotator at 50 rpm for 10 min. Then, the supernatant was recovered by centrifugation (3000 xg, 10 min) (Sorvall RC5C, Sorvall Instruments, Dupont, Willmington, DE, USA). The extracts were concentrated to 2 mL at 45 °C using a vacuum evaporator (Savant SC250 DDA Speed Vac Plus centrifugal, Holbrook, NY, USA) and stored at -20 °C until utilization. All extractions were made by triplicated. Bound phenolic compounds were extracted as reported by Adom and Liu (2002). The residues (pellets) from free phenolic extraction were hydrolyzed for 30 and 60 min with 10 mL of 2 M NaOH at 95 °C and 25 °C, respectively, in a shaking water bath at 60 rpm. The hydrolysate was neutralized with HCl before removing lipid with hexane. The final solution was extracted five times with 10 mL of ethyl acetate and the pool was evaporated to dryness. Bound phenolic compounds were reconstituted in 2 mL of 50 % methanol and stored at -20 °C until utilization. All extractions were made by triplicated.

### Antioxidant activity (AoxA)

Free and bound hydrophilic antioxidant capacities were determined with the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay and the ABTS radical cation decolorization assay, using a Microplate Reader (Synergy™ HT Multi-Detection, BioTek, Inc., Winooski, VT, USA). For ORAC assay the extracts were evaluated against a standard of Trolox with Fluorescein (Ou *et al.*, 2001). For ABTS assay the extracts were evaluated against a standard of Trolox (Re *et al.*, 1999). The results of AoxA were expressed as  $\mu\text{mol}$  of Trolox equivalents (TE)  $100\text{ g}^{-1}$  of dry weight (dw) sample. All measurements were made by triplicated.

### Total phenolic and flavonoid contents (TPC, FC)

The total phenolic and flavonoid contents of free and bound extracts from ground samples were evaluated according to Singleton *et al.* (1999) and Heimler *et al.* (2005), respectively. The absorbance was measured using a Microplate Reader (Synergy™ HT Multi-Detection, BioTek Inc., Winooski, VT, USA). Total phenolics were expressed as milligrams of Gallic acid equivalents (mg GAE)  $100\text{ g}^{-1}$  dry weight simple. Total

Las muestras bioprocesadas se secaron ( $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $8\text{ h}^{-1}$ ), enfriaron a temperatura ambiente ( $23\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y molieron. La harina obtenida de los cotiledones bioprocesados se mezcló con las cáscaras molidas para obtener las harinas de frijol tépari fermentado (FTBF). Las FTBF se empacaron y mantuvieron a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Además, molimos semillas de frijol tépari crudo y entero (malla 80-US=0.180 mm) para obtener harina de frijol de tépari sin procesar (UTBF), la cual se usó como testigo.

### Contenido proteico

El método oficial 960.52 de la AOAC (1999) se usó para determinar el contenido de proteína (Nx6.25).

### Extracción de compuestos fenólicos libres y ligados

Los compuestos fenólicos libres se extrajeron con la metodología Dewanto *et al.* (2002). Un gramo de muestra seca se agitó 10 min en 10 mL de una solución fría de etanol-agua (80:20, v/v) en un agitador rotativo de tubos a 50 rpm. Luego, el sobrenadante se recuperó por centrifugación (3000 xg, 10 min) (Sorvall RC5C, Sorvall Instruments, Dupont, Willmington, DE, EUA). Los extractos se concentraron a 2 mL con un evaporador de vacío (Savant SC250 DDA Speed Vac Plus centrifugal, Holbrook, NY, EUA) a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Todas las extracciones se realizaron por triplicado. Los compuestos fenólicos ligados se extrajeron con el método de Adom y Liu (2002). Los residuos (pellets) de la extracción de compuestos fenólicos libres se hidrolizaron 30 y 60 min con 10 mL de NaOH 2 M a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, en un baño María a 60 rpm. El hidrolizado se neutralizó con HCl antes de retirar los lípidos con hexano. La solución final se extrajo cinco veces con 10 mL de acetato de etilo y la mezcla se evaporó hasta alcanzar la sequedad. Los compuestos fenólicos enlazados se reconstituyeron en 2 mL de metanol al 50% y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Todas las extracciones se hicieron por triplicado.

### Actividad antioxidante (AoxA)

La capacidad antioxidante hidrofílica libre y ligada se determinó con el método de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y el método de decoloración del catión radical ABTS, utilizando un lector de microplacas (Synergy™ HT Multi-Detection, BioTek, Inc., Winooski, VT, EUA). Para la prueba de ORAC, los extractos se evaluaron contra un estándar de Trolox con fluoresceína (Ou *et al.*, 2001). Para la prueba del ABTS, los extractos se evaluaron contra un estándar de Trolox (Re *et al.*, 1999). Los resultados de la AoxA se expresaron como  $\mu\text{mol}$  equivalentes

flavonoids were expressed as milligrams Quercetin equivalents (mg QE) 100 g<sup>-1</sup> dry weight sample. All measurements were made by triplicated.

### Experimental design, statistical analysis, and optimization

The experimental design was a central composite with two factors [Fermentation temperature (FT), fermentation time (Ft)] and five variation levels for response surface methodology (RSM) (Table 1). With the stepwise regression procedure, non-significant terms ( $p > 0.1$ ) were deleted from a second order polynomial, and a new polynomial was used to obtain a predictive model for each response variable. The conventional graphical method was applied to obtain maximum protein content (PC), antioxidant activity (AoxA), and total phenolic content (TPC). Predictive models were used to graphically represent the system. Contour plots of each of the response variables were superimposed to obtain a contour plot for observation and selection of the best combination FT/Ft for producing optimized fermented tepary bean flour (OFTBF). The statistical software Design-Expert Version 7.0.0 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, USA) was used for the RSM analyses. Results of chemical composition and nutraceutical properties of OFTBF, and unprocessed tepary bean flour (UTBF) were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) and Student-Newman-Keuls multiple comparisons test among means ( $p \leq 0.05$ ).

### Macronutrients analysis

The official AOAC (1999) methods 925.09B and 920.39C were used to determine moisture, and lipids contents, respectively. Soluble and insoluble dietary fiber (SDF/IDF) were measured according to the AOAC (1999) enzymatic-gravimetric method (985.26) for total dietary fiber (TDF) and the TDF assay kit from Sigma-Aldrich (TDF 100A) was used.

### Essential amino acid (EAA) analysis, *in vitro* protein degradation (IVPD), chemical score (CS), and calculated protein efficiency ratio (C-PER)

EAA composition was evaluated according to López *et al.* (2006) using an analytical scale (4.6 mm×250 mm) hypersil ODS C18 column (SGE, Dandenong, Australia) kept at 38 °C and connected to an HPLC system (GBC, Dandenong, Australia) equipped with a fluorescence detector >LC 5100 set at 270 and 316 nm for excitation and emission, respectively. Tryptophan was detected at 280 nm with an ultraviolet detector.

The IVPD was calculated according to Hsu *et al.* (1977) using a multi-enzyme solution [8 mg of pancreatic trypsin

de Trolox (TE) 100 g<sup>-1</sup> de peso seco (dw) de la muestra. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

### Contenido de fenólicos total y contenido de flavonoides (TPC, FC)

El contenido de fenólicos total y de flavonoides de los extractos libres y ligados obtenidos de muestras molidas se evaluó con la metodología de Singleton *et al.* (1999) y Heimler *et al.* (2005), respectivamente. Las absorbancias se midieron con un lector de microplacas (Synergy™ HT Multi-Detection, BioTek Inc., Winooski, VT, EUA). Los fenólicos totales se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico (mg GAE) 100 g<sup>-1</sup> de peso seco simple. Los flavonoides totales se expresaron como miligramos equivalentes de quercetina (mg QE) 100 g<sup>-1</sup> de peso seco de la muestra. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

### Diseño experimental, análisis estadístico y optimización

El diseño experimental fue un compuesto central con dos factores [Temperatura de fermentación (FT), tiempo de fermentación (Ft)] y cinco niveles de variación de la metodología de superficie de respuesta (RSM) (Cuadro 1). Con el procedimiento de regresión paso a paso se eliminaron los términos no significativos ( $p > 0.1$ ) de un polinomio de segundo orden, y se usó un nuevo polinomio para obtener un modelo predictivo para cada variable de respuesta. El método gráfico convencional se aplicó para obtener los valores máximos del contenido de proteína (PC), la actividad antioxidante (AoxA) y el contenido de fenólicos total (TPC). Los modelos predictivos se usaron para representar el sistema de forma gráfica. Las gráficas de contornos de las variables de respuesta se sobrepusieron para obtener una gráfica de contornos para observar y seleccionar la mejor combinación de FT/Ft para producir una harina optimizada de frijol tépari fermentado (OFTBF). El software estadístico Design-Expert, Versión 7.0.0 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, EUA) se usó para los análisis de la RSM. Los resultados de la composición química y las propiedades nutraceuticas de la OFTBF y la harina de frijol tépari sin procesar (UTBF) se evaluaron con un análisis de varianza (ANDEVA) unilateral y la prueba de Student-Newman-Keuls para la comparación múltiple de las medias ( $p \leq 0.05$ ).

### Análisis de los macronutrientes

Los métodos oficiales 925.09B y 920.39C de la AOAC (1999) se usaron para determinar el contenido de humedad y de lípidos, respectivamente. La fibra dietaria soluble e insoluble (SDF/IDF) se midieron según el método AOAC (985.26, 1999) enzimático-gravimétrico para la fibra dietética total (TDF) y se usó el kit para prueba de la TDF de Sigma-Aldrich (TDF 100A).

type IX (15 600 U mg<sup>-1</sup>, Sigma T-0303), 15.5 mg of bovine pancreatic chymotrypsin type II (83.9 U mg<sup>-1</sup>, Sigma C-4129), 6.5 mg of porcine intestinal peptidase grade III (102 U g<sup>-1</sup>, Sigma P-7500) and 5 mL of distilled water]. Five milliliter aliquots of the multi-enzyme solution were added to 50 mL of aqueous protein suspension (6.25 g protein L<sup>-1</sup>, pH 8.0), with stirring at 37 °C in a water bath. The pH drop was recorded automatically over a 10 min period using a pH meter. IVPD was calculated as:

$$\text{IVPD} = 210.46 - 18.10 X, \text{ when } X = \text{pH after 10 min.}$$

The chemical score (CS) was calculated as:

$$\text{CS} = (\text{Content of the most limiting EAA/REAR}) \times 100$$

where, EAA: essential amino acid, REAR: recommended EAA requirement (FAO, 2013).

C-PER was evaluated as described by Satterlee *et al.* (1982) and summarized by the AOAC (1999). This procedure is based on the IVPD and the EAA composition of the optimized mixture. All determinations were made by triplicate.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Predictive models for protein content (PC), antioxidant activity (AoxA), and total phenolic content (TPC) of fermented tepary bean flours (FTBF)

The PC, AoxA, and TPC experimental values of the FTBF varied from 20.35 to 27.49% (dw), 7378 to 15 799 μmol Trolox equivalents (TE), and 219 to 367 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> sample (dw), respectively (Table 1).

Second order polynomial models showing the relationships among PC, AoxA, and TPC and process variables were obtained after regression and variance analyses. Predictive models using coded/uncoded variables for the response variables were:

#### Coded

$$\begin{aligned} \text{PC} &= 23.97 + 0.21(X_1) + 1.60(X_2) + 1.63(X_1)(X_2) \\ \text{AoxA} &= 12004.48 + 802.42(X_1) + 2820.57(X_2) - 520.65(X_2)^2 + 1188.50(X_1)(X_2) \\ \text{TPC} &= 332.0 + 25.98(X_1) + 43.36(X_2) - 21.62(X_1)^2 - 19.87(X_2)^2 \end{aligned}$$

### Análisis de aminoácidos esenciales (EAA), digestibilidad proteínica *in vitro* (IVPD), calificación química (CS) y relación de eficiencia proteínica calculada (C-PER)

La composición de EAA se evaluó según López *et al.* (2006) con una columna analítica (4.6 mm×250 mm) Hypersil ODS C18 (SGE, Dandenong, Australia) conservada a 38 °C y conectada a un sistema de HPLC (GBC, Dandenong, Australia) equipado con un detector de fluorescencia >LC 5100 configurado a 270 y 316 nm para la excitación y emisión, respectivamente. El triptófano se detectó a 280 nm con un detector ultravioleta.

La IVPD se calculó según Hsu *et al.* (1977) con una solución multienzimática [8 mg de tripsina pancreática tipo IX (15 600 U mg<sup>-1</sup>, Sigma T-0303), 15.5 mg de quimotripsina pancreática bovina tipo II (83.9 U mg<sup>-1</sup>, Sigma C-4129), 6.5 mg de peptidasa intestinal porcina grado III (102 U g<sup>-1</sup>, Sigma P-7500) y 5 mL de agua destilada]. Alícuotas de 5 mL de la solución multienzimática se añadieron a 50 mL de una suspensión proteica acuosa (6.25 g de proteína L<sup>-1</sup>, pH 8.0), con agitación a 37 °C en un baño María. La disminución del pH se registró de forma automática en un periodo de 10 min con un medidor de pH. La IVPD se calculó así:

$$\text{IVPD} = 210.46 - 18.10 X, \text{ cuando } X = \text{pH después de 10 min.}$$

La calificación química (CS) se calculó así:

$$\text{CS} = (\text{Contenido del EAA/REAR más limitante}) \times 100$$

donde, EAA: aminoácido esencial, REAR: requerimiento de EAA recomendado (FAO, 2013).

La C-PER se evaluó según lo descrito por Satterlee *et al.* (1982) y resumido por la AOAC (1999). Este procedimiento se basa en la IVPD y la composición de EAA de la mezcla optimizada. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Modelos predictivos para el contenido de proteína (PC), la actividad antioxidante (AoxA) y el contenido de fenólicos total (TPC) de harinas de frijol tépari fermentado (FTBF)

Los valores experimentales de PC, AoxA y TPC de las FTBF variaron de 20.35 a 27.49% (dw), 7378 a 15 799 μmol de TE 100 g<sup>-1</sup> de muestra (dw) y 219 a 367 mg de GAE 100 g<sup>-1</sup> de muestra (dw), respectivamente (Cuadro 1).

**Table 1.** Experimental design<sup>†</sup> used to obtain different combinations of fermentation temperature/time for producing fermented tepary bean flours, and experimental results for response variables.

**Cuadro 1.** Diseño experimental<sup>†</sup> usado para obtener diferentes combinaciones de temperatura/tiempo de fermentación para producir harinas de frijol tépari fermentado y resultados experimentales de las variables de respuesta.

Assay <sup>‡</sup>	Process variables <sup>§</sup>		Response variables <sup>¶</sup>		
	FT (°C)	Ft (h)	PC	AoxA	TPC
1	32	21	23.77	8854	<b>219</b>
2	39	21	<b>20.35</b>	7699	290
3	32	93	24.38	12 200	298
4	39	93	<b>27.49</b>	<b>15 799</b>	350
5	<b>30</b>	57	23.66	11 175	260
6	<b>40</b>	57	25.06	13 986	320
7	35	<b>6</b>	22.34	<b>7378</b>	220
8	35	<b>108</b>	25.91	15 240	<b>367</b>
9	35	57	23.67	12 379	339
10	35	57	23.49	11 979	330
11	35	57	25.04	11 419	325
12	35	57	23.07	11 873	323
13	35	57	23.39	11 912	343

<sup>†</sup>Central composite rotatable design with two factors and five levels; 13 assays. <sup>‡</sup>Does not correspond to order of processing. <sup>§</sup>FT: fermentation temperature; Ft: fermentation time. <sup>¶</sup>PC: protein content (% dw); AoxA: antioxidant activity [ $\mu\text{mol Trolox equivalents (TE) } 100 \text{ g}^{-1} \text{ (dw)}$ ]; TPC=total phenolic content [mg Gallic acid equivalents (GAE)  $100 \text{ g}^{-1} \text{ (dw)}$ ]. <sup>✱</sup> <sup>†</sup>Diseño compuesto central rotatable con dos factores y cinco niveles; 13 pruebas. <sup>‡</sup>No corresponde al orden de procesamiento. <sup>§</sup>FT: temperatura de fermentación; Ft: tiempo de fermentación. <sup>¶</sup>PC: contenido de proteína (% dw); AoxA: actividad antioxidante [ $\mu\text{mol de equivalentes de Trolox (TE) } 100 \text{ g}^{-1} \text{ (dw)}$ ]; TPC: contenido de fenólicos total [mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)  $100 \text{ g}^{-1} \text{ (dw)}$ ].

## Uncoded

$$\begin{aligned} \text{PC} &= 45.51 - 0.68(\text{TF}) - 0.41(\text{tF}) + 0.013(\text{TF})(\text{tF}) \\ \text{AoxA} &= 17181.25 - 308.39(\text{TF}) - 210.71(\text{tF}) \\ &\quad - 0.40(\text{tF})^2 + 9.43(\text{TF})(\text{tF}) \\ \text{TPC} &= -2274.73 + 132.76(\text{TF}) + 2.95(\text{tF}) \\ &\quad - 1.76(\text{TF})^2 - 0.015(\text{tF})^2 \end{aligned}$$

The regression models explained 87.39%, 97.20%, and 95.61% of the total variability ( $p \leq 0.0002$ ) in PC, AoxA, and TPC, respectively. The lack of fit was not significant ( $p > 0.05$ ), and the relative dispersion of the experimental points from the predictions of the models (CV) was  $< 10\%$ . These values indicated that the experimental models were adequate and reproducible. PC, AoxA, and TPC of fermented tepary bean flours increased with FT and Ft, until reach maximum values between 35–40 °C and 60–107 h (Figures 1A, 1B, 1C).

Los modelos polinomiales de segundo orden que muestran las relaciones entre el PC, la AoxA y el TPC y las variables del proceso se obtuvieron después de los análisis de regresión y varianza. Los modelos predictivos usando variables codificadas/no codificadas para las variables de respuesta fueron:

## Codificadas

$$\begin{aligned} \text{PC} &= 23.97 + 0.21(X_1) + 1.60(X_2) + 1.63(X_1)(X_2) \\ \text{AoxA} &= 12004.48 + 802.42(X_1) + 2820.57(X_2) \\ &\quad - 520.65(X_2)^2 + 1188.50(X_1)(X_2) \\ \text{TPC} &= 332.0 + 25.98(X_1) + 43.36(X_2) - 21.62(X_1)^2 \\ &\quad - 19.87(X_2)^2 \end{aligned}$$

## No codificadas

$$\begin{aligned} \text{PC} &= 45.51 - 0.68(\text{TF}) - 0.41(\text{tF}) + 0.013(\text{TF})(\text{tF}) \\ \text{AoxA} &= 17181.25 - 308.39(\text{TF}) - 210.71(\text{tF}) \\ &\quad - 0.40(\text{tF})^2 + 9.43(\text{TF})(\text{tF}) \end{aligned}$$



### Optimization

Figure 1D, obtained of the superimposition of contour plots (Figures 1A, 1B, 1C), was utilized to determine the best combination of process variables for production of optimized fermented tepary bean (OFTBF). The central point of the optimization region in Figure 1D corresponds to the optimum combination of bioprocess variables (FT=37.6 °C/Ft=96.2 h) for OFTBF production with highest PC, AoxA, and TPC values. The predicted values of PC, AoxA, and TPC using the predictive models of each response variable and the optimal conditions of bioprocessing were 26.9% (dw), 15 716  $\mu\text{mol TE}/100$  sample (dw), and 363.4 mg GAE/100 sample (dw), respectively. OFTBF was produced applying the best combination of solid state bioprocess variables; the experiment using optimal conditions was replicated 3 times. The experimental values of PC, AoxA, and TPC of OFTBF (Tables 2 and 3) were similar to the predicted values, above mentioned, indicating that the optimal conditions of solid state bioprocess were appropriated and reproducible.

### Chemical composition and nutritional properties of OFTBF

Table 2 shows the proximate composition and some nutritional properties of unprocessed and optimized tepary bean flours (UTBF, OFTBF). SSF increased protein content (+35%) and decreased ( $p \leq 0.05$ ) lipid content (-48.3%) of tepary bean. This increase in protein content reflects the increase in mold biomass and the decrease in other constituents, which might be lost by leaching during the initial steps (soaking, cooking) of SSF or might be consumed by the fungus for its growth (Reyes *et al.*, 2010, Sánchez *et al.*, 2014). *Rhizopus oligosporus* produces lipases that release fatty acids, which are oxidized and used by the fungus as a source of energy, in agreement with a substantial reduction in crude lipids during the early stages of soybean fermentation.

Soluble, insoluble and total dietary fiber in tepary increased in 142%, 82.7%, and 86.1%, respectively, after bioprocessing (Table 2). These changes may be due to leaching out some compounds during steeping and cooking steps (before fermentation) and to fungi grow which have consumed carbohydrates and fat as energy sources and the development of a fiber-rich

$$\text{TPC} = -2274.73 + 132.76(\text{TF}) + 2.95(\text{tF}) - 1.76(\text{TF})^2 - 0.015(\text{tF})^2$$

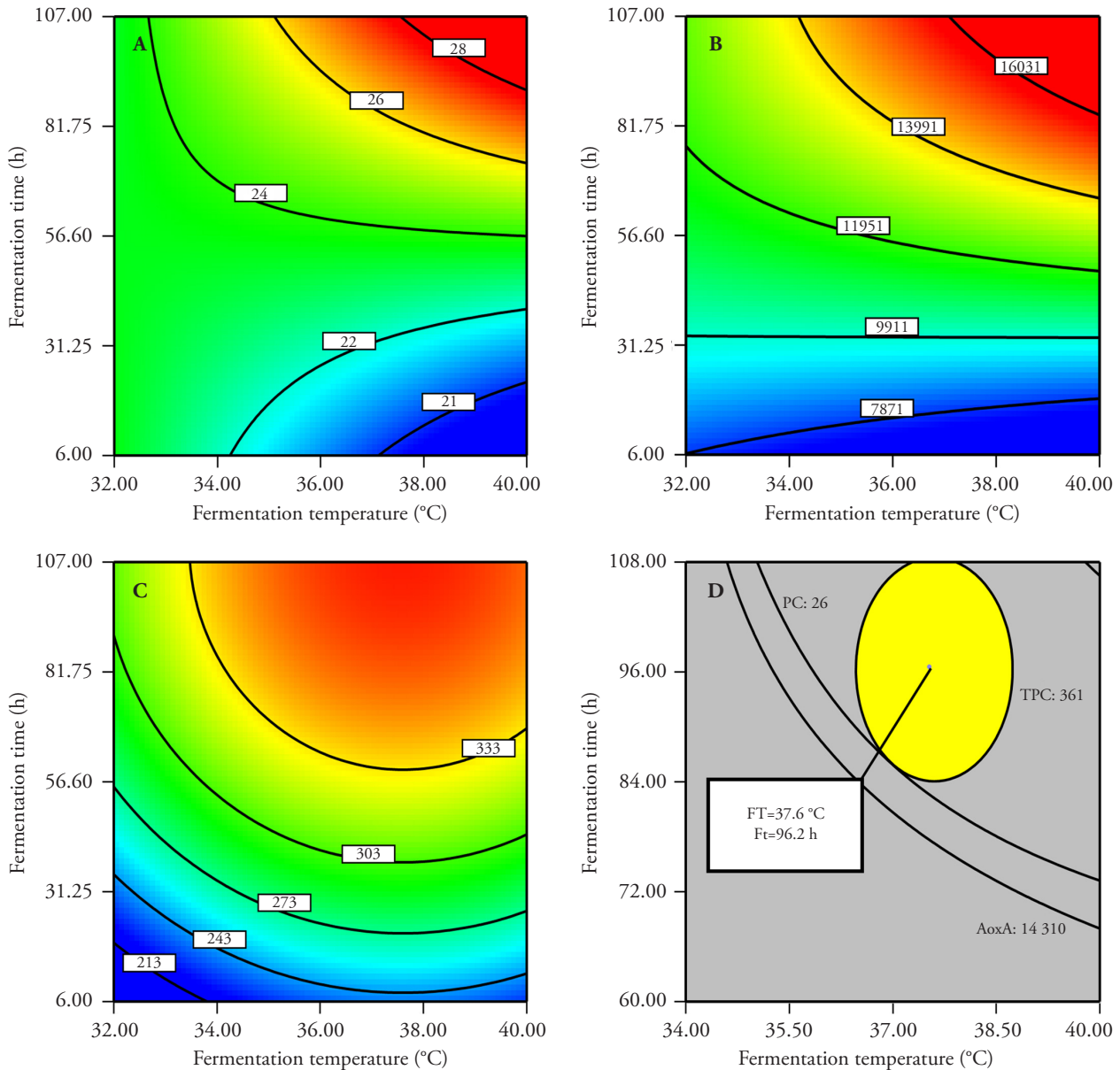
Los modelos de regresión explicaron 87.39%, 97.20% y 95.61% de la variabilidad total ( $p \leq 0.0002$ ) en el PC, la AoxA y el TPC, respectivamente. La falta de ajuste no fue significativa ( $p > 0.05$ ) y la dispersión relativa de los puntos experimentales obtenida de las predicciones de los modelos (CV) fue  $< 10\%$ . Estos valores indican que los modelos experimentales fueron adecuados y reproducibles. El PC, la AoxA y el TPC de las harinas de frijol tépari fermentado aumentaron con la FT y el Ft, hasta alcanzar valores máximos de 35-40 °C a 60-107 h (Figuras 1A, 1B, 1C).

### Optimización

La Figura 1D, obtenida de la superposición de las gráficas de contornos (Figuras 1A, 1B, 1C), se utilizó para determinar la mejor combinación de las variables del proceso para la producción de harinas optimizadas de frijol tépari fermentado (OFTBF). El punto central de la región de optimización en la Figura 1D corresponde a la combinación óptima de las variables del proceso (FT=37.6 °C/Ft=96.2 h) para la producción de OFTBF con valores más altos de PC, AoxA y TPC. Los valores predichos de PC, AoxA y TPC obtenidos con los modelos predictivos de cada variable de respuesta y las condiciones óptimas del bioproceso fueron 26.9% (dw), 15 716  $\mu\text{mol de TE}100 \text{ g}^{-1}$  de muestra (dw) y 363.4 mg de GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  de muestra (dw), respectivamente. La mejor combinación de variables del bioproceso en estado sólido se usó para obtener la OFTBF; este experimento se repitió tres veces usando condiciones óptimas. Los valores experimentales de PC, AoxA y TPC de las OFTBF (Cuadros 2 y 3) fueron similares a los predichos, ya mencionados, lo que indica que las condiciones óptimas del bioproceso en estado sólido fueron adecuadas y reproducibles.

### Composición química y propiedades nutricionales de la OFTBF

El Cuadro 2 presenta la composición proximal y algunas propiedades nutricionales de harina de frijol tépari no procesado y de la harina de frijol tépari optimizada (UTBF, OFTBF). La SSF aumentó el contenido de proteína (+35%) y disminuyó ( $p \leq 0.05$ ) el contenido de lípidos (-48.3%) del frijol tépari. Este



**Figure 1.** Contour plots showing the effect of fermentation temperature and time on (A) protein content, (B) antioxidant activity, and (C) total phenolic content, and (D) region of the best combination of process variables (FT=fermentation temperature, Ft=fermentation time) for production of optimized fermented tepary bean flour (OFTBF) through solid state fermentation bioprocess.

**Figura 1.** Gráficas de contornos que muestran el efecto de la temperatura y tiempo de fermentación en (A) el contenido de proteína, (B) la actividad antioxidante y (C) el contenido de fenólicos total. En (D) se observa la región de la mejor combinación de las variables del proceso (FT=temperatura de fermentación, Ft=tiempo de fermentación) para la producción de harinas optimizadas de frijol tépari fermentado (OFTBF) a través del bioproceso de fermentación en estado sólido.

fungous mycelium. This fiber increase comes from intrinsic chitin production of *Rhizopus*; the fungi produce several polysaccharides, which are commonly cellulose and chitin (Griffin, 1994). Yoon *et al.* (2010) reported increases in dietary fiber content higher than 100% in fermented rice bran using four fungi

aumento en el contenido de proteína refleja el aumento de la biomasa del hongo y la disminución de otros componentes, que se podrían perder por lixiviación durante los pasos iniciales (remojo, cocción) de la SSF o podrían ser consumidos por el hongo para su crecimiento (Reyes *et al.*, 2010, Sánchez *et al.*, 2014).

**Table 2.** Chemical composition and nutritional properties of tepary bean flours.  
**Cuadro 2.** Composición química y propiedades nutricionales de harinas de frijol tépari.

Property	Unprocessed tepary bean flour	OFTBF <sup>†</sup>	Requirements FAO <sup>‡</sup>
Chemical composition (% dw)			
Proteins	18.76±0.23 <sup>b</sup>	25.33±0.15 <sup>a</sup>	
Lipids	1.77±0.10 <sup>a</sup>	0.93±0.05 <sup>b</sup>	
Dietary fiber			
Soluble	0.57±0.05 <sup>b</sup>	1.38±0.06 <sup>a</sup>	
Insoluble	9.23±1.50 <sup>b</sup>	16.86±2.20 <sup>a</sup>	
Total	9.80±1.50 <sup>b</sup>	18.24±2.10 <sup>a</sup>	
Nutritional			
Essential aminoacids (EAA) <sup>§</sup>			
His	2.39±0.03 <sup>b</sup>	2.61±0.01 <sup>a</sup>	1.6
Ile	3.95±0.02 <sup>b</sup>	4.32±0.04 <sup>a</sup>	3.0
Leu	6.90±0.05 <sup>a</sup>	6.82±0.02 <sup>a</sup>	6.1
Lys	6.41±0.03 <sup>a</sup>	6.30±0.05 <sup>b</sup>	4.8
Met+Cys	2.43±0.04 <sup>b</sup>	2.83±0.03 <sup>a</sup>	2.3
Phe+Tyr	8.25±0.07 <sup>b</sup>	8.95±0.06 <sup>a</sup>	4.1
Thr	4.12±0.04 <sup>b</sup>	4.50±0.02 <sup>a</sup>	2.5
Trp	1.12±0.02 <sup>a</sup>	1.03±0.01 <sup>b</sup>	0.66
Val	4.65±0.03 <sup>b</sup>	4.83±0.02 <sup>a</sup>	4.0
Total	40.22	42.19	29.06
EAA <sup>§</sup> chemical score	100	100	
Limiting EAA <sup>§</sup>	---	---	
IVPD <sup>b</sup>	67.48±1.23 <sup>b</sup>	79.32±1.23 <sup>a</sup>	
C-PER <sup>c</sup>	1.73	2.29	

Data are expressed as means±standard deviation. Means with different letter in a row are statistically different (SNK,  $p \leq 0.05$ ). <sup>†</sup>OFTBF: optimized fermented tepary bean flour. <sup>‡</sup>Requirements of amino acids for older child, adolescent, and adult (3 years and older) according FAO (2013). <sup>§</sup>EAA: essential amino acid (g 100 g<sup>-1</sup> protein). <sup>b</sup>IVPD: *in vitro* protein digestability (%). <sup>c</sup>C-PER: calculated protein efficiency ratio. v Los datos corresponden a las medias ± desviación estándar. Las medias con letras diferentes en una hilera son estadísticamente diferentes (SNK,  $p \leq 0.05$ ). <sup>†</sup>OFTBF: harina optimizada de frijol tépari fermentado. <sup>‡</sup>Requerimientos de aminoácidos para niños (de 3 años en adelante), adolescentes y adultos conforme a la FAO (2013). <sup>§</sup>EAA: aminoácido esencial (g 100 g<sup>-1</sup> de proteína). <sup>b</sup>IVPD: digestibilidad proteínica *in vitro* (%). <sup>c</sup>C-PER: relación de eficiencia proteínica calculada.

(*Monascus ruber*, *Phellinus linteus*, *Cordyceps sinensis*, *Agaricus blazei*).

The EAA content of proteins from unprocessed tepary bean flour was improved by the SSF process; the content of His, Ile, total sulfur (Met+Cys), total aromatic (Phe+Tyr), Thr and Val increased in 0.22, 0.37, 0.43, 0.70, 0.38, and 0.18 g 100 g<sup>-1</sup> protein, respectively. However, Lys and Trp levels decreased 0.11 and 0.09 g 100 g<sup>-1</sup> protein, respectively, although their final content was still higher than that of the reference standards (40.22 vs. 29.06 g 100 g<sup>-1</sup> protein) (Table 3). It appears that the fungus does not depend on a specific amino acid for growth, and its effect on the amino acid composition depends on

*Rhizopus oligosporus* produce lipasas que liberan ácidos grasos, los cuales el microorganismo oxida y utiliza como fuente de energía, lo que coincide con la importante reducción de lípidos durante las primeras etapas de la fermentación de la soya.

La fibra dietética soluble, insoluble y total del frijol tépari aumentó en 142%, 82.7% y 86.1%, respectivamente, después de la fermentación (Tabla 2). Estos cambios se pueden deber a la pérdida por lixiviación de algunos compuestos durante el remojo y la cocción (antes de la fermentación) y por el crecimiento fúngico, el cual requiere de los carbohidratos y grasas como fuentes de energía, y el desarrollo de un micelio fúngico rico en fibra. Este aumento de la fibra viene de

**Table 3.** Antioxidant activity and phytochemicals content of tepary bean flours.**Cuadro 3.** Actividad antioxidante y contenido de fitoquímicos de las harinas de frijol tépari.

Property	Unprocessed tepary bean flour	OFTBF <sup>†</sup>
Antioxidant activity ORAC <sup>‡</sup>		
Free phytochemicals	2446±317 <sup>b</sup>	9520±160 <sup>a</sup>
Bound phytochemicals	4438±169 <sup>b</sup>	5418±256 <sup>a</sup>
Total phytochemicals	6885±205 <sup>b</sup>	14 938±208 <sup>a</sup>
Antioxidant activity ABTS <sup>§</sup>		
Free phytochemicals	2302±87 <sup>b</sup>	8365±79 <sup>a</sup>
Bound phytochemicals	5867±60 <sup>b</sup>	7048±73 <sup>a</sup>
Total phytochemicals	8169±147 <sup>b</sup>	15 413±152 <sup>a</sup>
Phenolic content <sup>§</sup>		
Free phenolics	15.38±1.15 <sup>b</sup>	177.26±9.40 <sup>a</sup>
Bound phenolics	92.25±0.38 <sup>b</sup>	151.01±8.89 <sup>a</sup>
Total phenolics	110.64±1.34 <sup>b</sup>	328.27±9.15 <sup>a</sup>
Flavonoid content <sup>¶</sup>		
Free flavonoids	29.53±0.47 <sup>b</sup>	64.20±5.47 <sup>a</sup>
Bound flavonoids	53.93±1.96 <sup>b</sup>	71.65±2.25 <sup>a</sup>
Total flavonoids	83.46±1.87 <sup>b</sup>	135.85±2.10 <sup>a</sup>

Data are expressed as means±standard deviation. Means with different letter in a row are statistically different (SNK,  $p \leq 0.05$ ). <sup>†</sup>OFTBF: optimized fermented tepary bean flour. <sup>‡</sup> $\mu\text{mol}$  Trolox equivalents (TE) 100  $\text{g}^{-1}$  sample (dw). <sup>§</sup>mg Gallic acid equivalents (GAE) 100  $\text{g}^{-1}$  sample (dw). <sup>¶</sup>mg Quercetin equivalents (QE) 100  $\text{g}^{-1}$  sample (dw). \* Los datos corresponden a las medias ± desviación estándar. Las medias con letras diferentes en una hilera son estadísticamente diferentes (SNK,  $p \leq 0.05$ ). <sup>†</sup>OFTBF: harina optimizada de frijol tépari fermentado. <sup>‡</sup> $\mu\text{mol}$  de equivalentes de Trolox (TE) 100  $\text{g}^{-1}$  de muestra (dw). <sup>§</sup>mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) 100  $\text{g}^{-1}$  de muestra (dw). <sup>¶</sup>mg de equivalentes de quercetina (QE) 100  $\text{g}^{-1}$  de muestra (dw).

the substrate. The SSF bioprocess improved the IVPD (from 67.48 to 79.32), and C-PER (from 1.73 to 2.29) of the tepary bean seeds (Table 3). Niveditha *et al.* (2016) studied the effect of fermentation on protein and essential amino acids content in the wild legume *Canavalia cathartica*; they observed that Lys was significantly increased, while His and Trp were confined only to fermented kernels. The IVPD was also significantly increased in fermented kernels with an improvement in protein efficiency ratio (PER). The increased IVPD could be explained by denaturing of proteins during the cooking step, making them more susceptible to enzymatic hydrolysis, and the elimination of antinutritional factors (*e.g.* hydrolysis of phytic acid during fermentation).

#### Effect of SSF at optimal conditions on AoxA, and TPC, and FC contents

The AoxA, TPC, and FC values of fermented and control tepary beans were compared, and the results are summarized in Table 3. AoxA of tepary bean

la producción intrínseca de quitina por *Rhizopus*; este hongo produce diversos polisacáridos, principalmente celulosa y quitina (Griffin, 1994). Yoon *et al.* (2010) reportaron aumentos en el contenido de fibra dietética mayores al 100 % en salvado de arroz fermentado con cuatro hongos (*Monascus ruber*, *Phellinus linteus*, *Cordyceps sinensis*, *Agaricus blazei*).

El contenido de EAA de las proteínas de la harina de frijol tépari sin procesar mejoró con la SSF; el contenido de His, Ile, azufre total (Met+Cys), aromático total (Phe+Tyr), Thr y Val aumentó 0.22, 0.37, 0.43, 0.70, 0.38 y 0.18  $\text{g}$  100  $\text{g}^{-1}$  de proteína, respectivamente. Sin embargo, los niveles de Lys y Trp disminuyeron 0.11 y 0.09  $\text{g}$  100  $\text{g}^{-1}$  de proteína, respectivamente, aunque su contenido final fue mayor al de los estándares de referencia (40.22 *versus* 29.06  $\text{g}$  100  $\text{g}^{-1}$  de proteína) (Cuadro 3). Al parecer, el hongo no depende de un aminoácido específico para su crecimiento, y su efecto en la composición de aminoácidos depende del sustrato. El bioproceso SSF mejoró la IVPD (de 67.48 a 79.32) y la C-PER (de 1.73 a 2.29) de las semillas de frijol tépari (Cuadro 3). Niveditha

increased with bioprocessing at optimal conditions (Fermentation temperature=37.6 °C/Fermentation time=96.2 h) (Table 3). The AoxA, evaluated by ORAC assay, for free, bound and total phytochemicals increased in 289%, 22%, and 117%, respectively, after fermentation (Table 3). Both, ORAC and ABTS methods showed a similar tendency. The fermentation process improves the antioxidant activity of legumes (Cheng *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2014; Rochín *et al.*, 2015). The AoxA of fermented tepary bean might be attributed to various groups, namely free amino acids, peptides and phenolic compounds; during fermentation process, nutritional quality of fermented tepary bean increased because some enzymes such as amylases, xylanases, and proteases derived from the grain and microorganisms contribute to the modification of grain composition (Katina *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007; Hur *et al.*, 2014).

As shown in Table 3, the SSF bioprocess increased free (+1052%), bound (+63.7%), and total (+196.7%) phenolic contents, and free (+117.4%), bound (32.8%) and total (+62.8%) flavonoid contents of the raw tepary bean seeds. Dordević *et al.* (2010) showed that the fermentation of buckwheat by *S. cerevisiae* and *L. rhamnosus* caused the increasing of TPC compared to nonfermented samples. Duenas *et al.* (2012) found significant increase of phenolic acid content in the soybean fermented with *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae*, and *Bacillus subtilis*.

Cheng *et al.* (2013) suggested that fungal  $\beta$ -glucosidase catalyzes the release of aglycones from the bean substrate and, consequently, there is an increment in phenolic content and isoflavones type flavonoids. The improvement of antioxidant activity by fermentation is mainly due to an increase in phenolic compounds and flavonoids via microbial hydrolysis. Microbial enzymes hydrolyse phenolic glycosides and release the aglycone, which has antioxidant activity. The effect of bacterial fermentation on antioxidant activity can be summarized with enzymatic and non-enzymatic antioxidative activities. Moreover, fermentation induces the structural breakdown of plant cell walls, leading to the liberation or synthesis of various antioxidant compounds (Hur *et al.*, 2014). Schmidt *et al.* (2014) investigated the effect of solid state fermentation by *R. oryzae* on the profile of phenolic acids derived from rice bran and the content of chlorogenic, *p*-Hydroxybenzoic, and vanillic acids significantly increased during fermentation. According

*et al.* (2016) estudiaron el efecto de la fermentación en el contenido de proteína y de aminoácidos esenciales en la leguminosa silvestre *Canavalia cathartica*; observaron que la Lys aumentó significativamente, mientras que la His y el Trp se encontraron sólo en los granos fermentados. La IVPD también aumentó significativamente en los granos fermentados, así como la relación de eficiencia proteínica (PER). El incremento de la IVPD se puede deber a la desnaturalización de las proteínas durante el proceso de cocción, lo que las hace más susceptibles a la hidrólisis enzimática, y la eliminación de factores antinutricionales (*e.g.* la hidrólisis de ácido fítico durante la fermentación).

### Efecto de la SSF en condiciones óptimas sobre la AoxA, el TPC y el FC

Los valores de AoxA, TPC y FC del frijol tépari fermentado y el testigo se compararon y los resultados se resumen en el Cuadro 3. La AoxA del frijol tépari aumentó con la SSF a condiciones óptimas (Temperatura de fermentación=37.6 °C/tiempo de fermentación=96.2 h) (Cuadro 3). La AoxA, evaluada con el método de ORAC, de los fitoquímicos libres, ligados y totales, aumentó en un 289%, 22% y 117%, respectivamente, después de la fermentación (Cuadro 3). Ambos métodos, ORAC y ABTS, mostraron una tendencia similar. El proceso de fermentación mejora la actividad antioxidante de las leguminosas (Cheng *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2014; Rochín *et al.*, 2015). La AoxA del frijol tépari fermentado se puede atribuir a varios grupos, como aminoácidos, péptidos y compuestos fenólicos libres; durante el proceso de fermentación, la calidad nutricional del frijol tépari fermentado aumentó ya que algunas enzimas, como las amilasas, xilanasas y proteasas, de las semillas y de los microorganismos contribuyen a la modificación de la composición del grano (Katina *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007; Hur *et al.*, 2014).

Como se muestra en el Cuadro 3, la SSF aumentó el contenido de compuestos fenólicos libres (+1052%), ligados (+63.7%) y total (+196.7%); así como el contenido de flavonoides libres (+117.4%), ligados (+32.8%) y total (+62.8%) de las semillas de frijol tépari crudas. Dordević *et al.* (2010) mostraron que la fermentación de alforfón por *S. cerevisiae* y *L. rhamnosus* aumentó el TPC, comparado con las muestras no fermentadas. Duenas *et al.* (2012) reportaron un aumento significativo del contenido de ácido

to Schmidt *et al.* (2014), an incubation at 30 °C for 120 h with *R. oryzae* led to the most substantial increase in gallic and ferulic acids contents. In addition to phenolic acids, the enhancement of the flavonoid content is known; soybeans incubated with *A. oryzae* at 30 °C for 48 h resulted in a 23-fold increase in Genistein aglycones when compared to the content found in unfermented soybean flour (Da Silva *et al.*, 2011). The amount of these aglycones was also higher in solid state fermentations of soybean with *Rhizopus* spp. (Cheng *et al.*, 2013) and *Monascus purpureus* (Handa *et al.*, 2014), as compared to unfermented soybeans.

Different food graded lactic acid bacteria and *Bacillus* spp. were evaluated for their potential to release phenolic acids, as well as flavonoids from plant sources such as cereals (Hole *et al.*, 2012), and soybean (Cho *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2011). Fermentation of grain barley with three lactic acid bacteria strains significantly increased ferulic and *p*-coumaric acids, which contributed to an increase in the total content of bound phenolic acids by 23%, as compared to native grain barley (Hole *et al.*, 2012).

The change in the profile of phenolic compounds by the SSF bioprocess is due to the action of cellulolytic, ligninolytic and pectinolytic enzymes, mainly produced during the growth of the microorganisms. These enzymes break down the chemical components of plant cell walls, resulting in the hydrolysis of the ester bonds, which link phenolic compounds to the cell wall matrix, and in the oxidative degradation of lignin. As a consequence, the free phenolic compounds, as well as bound forms, are released more efficiently from the plant matrix. Among these enzymes,  $\beta$ -glucosidase is an enzyme responsible for catalyzing the hydrolysis of glycosidic linkages in alkyl and aryl- $\beta$ -D-glucosides, to release phenolic aglycone moieties. Cai *et al.* (2011) and Schmidt *et al.* (2014) studied the SSF bioprocess of oat and rice bran and pointed out that esterases produced by filamentous fungi increased the content of phenolic acids (ferulic, caffeic, *p*-poumaric).

Gan *et al.* (2016) reported that fermentation of eight common edible legumes by naturally occurring bacteria on legumes and lactic acid bacteria enhanced total phenolic content in all of the selected legumes, which could be associated with the biotransformation between soluble phenolics and the release of bound phenolics induced by microorganisms involved in the

fenólico en la soya fermentada con *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae* y *Bacillus subtilis*.

Cheng *et al.* (2013) sugirieron que la  $\beta$ -glucosidasa fúngica cataliza la liberación de agliconas del sustrato de frijol y, en consecuencia, aumenta el contenido fenólico y de flavonoides tipo isoflavona. La mejora de la actividad antioxidante por medio de la fermentación se debe principalmente al aumento de los compuestos fenólicos y flavonoides por hidrólisis microbiana. Las enzimas microbianas hidrolizan los glucósidos fenólicos y liberan aglicona, la cual tiene actividad antioxidante. El efecto de la fermentación bacteriana en la actividad antioxidante se puede resumir con actividades antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. Además, la fermentación induce la degradación estructural de las paredes de las células vegetales, lo que genera la liberación o síntesis de varios compuestos antioxidantes (Hur *et al.*, 2014). Schmidt *et al.* (2014) investigaron el efecto de la fermentación en estado sólido por *R. oryzae* en el perfil de ácidos fenólicos derivados del salvado de arroz, y el contenido de ácido clorogénico, *p*-hidroxibenzoico y vanílico tuvo un aumento significativo durante la fermentación. Según Schmidt *et al.* (2014), una incubación a 30 °C durante 120 h con *R. oryzae* causó el aumento más sustancial del contenido de ácido gálico y ferúlico. Aunado a los ácidos fenólicos, se conoce el aumento del contenido de flavonoides; la soya incubada con *A. oryzae* a 30 °C por 48 h aumentó 23 veces la aglicona genistina, comparado con el contenido encontrado en la harina de soya no fermentada (Da Silva *et al.*, 2011). La cantidad de estas agliconas también fue mayor en las fermentaciones en estado sólido de la soya con *Rhizopus* spp. (Cheng *et al.*, 2013) y *Monascus purpureus* (Handa *et al.*, 2014), a diferencia de la soya no fermentada.

Diferentes bacterias ácido lácticas de grado alimenticio y *Bacillus* spp. se evaluaron por su potencial para liberar ácidos fenólicos y flavonoides de fuentes vegetales, como cereales (Hole *et al.*, 2012) y soya (Cho *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2011). La fermentación de granos de cebada con tres cepas de bacterias ácido-lácticas aumentó significativamente el ácido ferúlico y *p*-cumárico, que contribuyen al incremento del contenido total de ácidos fenólicos ligados en un 23%, en comparación con los granos de cebada nativos (Hole *et al.*, 2012).

El cambio en el perfil de compuestos fenólicos por el bioproceso SSF se debe a la acción de enzimas

fermentation process. Fermentation could increase the bioavailability of legume polyphenols, and fermented legume powders rich in antioxidant polyphenols can be used to develop novel functional foods.

## CONCLUSIONS

The solid state fermentation (SSF) process produced optimized fermented tepary bean flour (OFTBF) with acceptable antioxidant and nutritional properties, for which the response surface methodology was used as useful tool for optimization. The optimum combination of process variables for production of OFTBF through the SSF process was  $37.6\text{ }^{\circ}\text{C}$   $96.2\text{ h}^{-1}$ . SSF increased *in vitro* protein digestibility, calculated protein efficiency ratio, antioxidant activity (ORAC, ABTS), and total phenolic, and flavonoid contents. Based mainly on its antioxidant and nutritional characteristics, OFTBF may be considered for the fortification of cereal-based food products for human consumption.

## LITERATURE CITED

- Adom, K. K., and R. H. Liu. 2002. Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6182-6187.
- AOAC. 1999. Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
- Bahaciu, G. V., R. Segal, and C. G. Nicolae. 2015. Improvement of the antioxidant activity of soybean (*Glycine max.*) by biotechnological processing. *Romanian Biotech.* 20: 10213-10220.
- Bhanja, D., and R. C. Kuhad. 2014. Upgrading the antioxidant potential of cereals by their fungal fermentation under solid-state cultivation conditions. *Letters Appl. Microbiol.* 59: 493-499.
- Cai, S., O. Wang, W. Wu, S. Zhu, F. Zhou, B. Ji, F. Gao, D. Zhang, J. Liu, and Q. Cheng. 2011. Comparative study of the effects of solid-state fermentation with three filamentous fungi on the total phenolics content (TPC), flavonoids, and antioxidant activities of subfractions from oats (*Avena sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 60: 507-513.
- Cheng, K. C., J. Y. Wu, J. T. Lin, and W. H. Liu. 2013. Enhancements of isoflavone aglycones, total phenolic content, and antioxidant activity of black soybean by solid-state fermentation with *Rhizopus* spp. *Eur. Food Res. Int.* 236: 1107-1113.
- Cho, K. M., S. Y. Hong, R. K. Math, J. H. Lee, D. M. Kambirnad, J. M. Kim, S. M. A. Islam, M. G. Yun, J. J. Cho, W. J. Lim, and H. D. Yun. 2009. Biotransformation of phenolics (isoflavones, flavanols and phenolic acids) during the fermentation of cheonggukjang by *Bacillus pumilus* HY1. *Food Chem.* 114: 413-419.
- Chung, I. M., S. H. Seo, J. K. Ahn, and S. H. Kim. 2011. Effect of processing, fermentation, and aging treatment to content

celulolíticas, ligninolíticas y pectinolíticas, producidas principalmente durante el crecimiento de los microorganismos. Estas enzimas degradan los componentes químicos de las paredes de las células vegetales lo que resulta en la hidrólisis de enlaces éter, los cuales unen los compuestos fenólicos a la matriz de la pared celular, y en la degradación oxidativa de la lignina. Como consecuencia, los compuestos fenólicos libres, al igual que las formas ligadas, se liberan con mayor eficiencia de la matriz vegetal. Entre estas enzimas, la  $\beta$ -glucosidasa es la enzima responsable de hidrolizar los enlaces glucosídicos de los alquil y aril- $\beta$ -D-glucósidos y liberar agliconas fenólicas. Cai *et al.* (2011) y Schmidt *et al.* (2014) estudiaron el bioproceso de la SSF de la avena y el salvado de arroz, y encontraron que las esterases producidas por hongos filamentosos aumentaron el contenido de ácidos fenólicos (ferúlico, cafeico, *p*-pumárico).

Gan *et al.* (2016) reportaron que la fermentación de ocho leguminosas comestibles por bacterias naturales de las leguminosas y bacterias ácido-lácticas aumentó el contenido fenólico total en todas las leguminosas seleccionadas, lo cual podría estar relacionado con la biotransformación entre compuestos fenólicos solubles y la liberación de fenólicos enlazados inducida por los microorganismos involucrados en el proceso de fermentación. La fermentación puede aumentar la biodisponibilidad de los polifenoles de las leguminosas, y los polvos de leguminosas fermentadas ricos en polifenoles antioxidantes se pueden utilizar para desarrollar nuevos alimentos funcionales.

## CONCLUSIONES

El proceso de fermentación en estado sólido (SSF) produjo una harina optimizada de frijol tépari fermentado (OFTBF) con propiedades antioxidantes y nutricionales aceptables, para lo cual se usó la metodología de superficie de respuesta como una herramienta útil para la optimización. La combinación óptima de las variables del proceso para la producción de la OFTBF a través del proceso de SSF fue  $37.6\text{ }^{\circ}\text{C}$   $96.2\text{ h}^{-1}$ . La SSF aumentó la digestibilidad proteínica *in vitro*, la relación de eficiencia proteínica calculada, la actividad antioxidante (ORAC, ABTS), y los contenidos de fenólicos totales y de flavonoides. Con base principal en sus características antioxidantes y nutricionales, la OFTBF se puede considerar para la

- and profile of phenolic compounds in soybean seed, soy curd and soy paste. *Food Chem.* 127: 960-967.
- Da Silva, L. H., R. M. S. Celeghini, and Y. K. Chang. 2011. Effect of the fermentation of whole soybean flour on the conversion of isoflavones from glycosides to aglycones. *Food Chem.* 128: 640-644.
- Díaz, A. B., A. Blandino, C. Webb, and I. Caro. 2016. Modelling of different enzyme productions by solid-state fermentation on several agro-industrial residues. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 820-827.
- Dewanto, V., X. Wu, and R. H. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4959-4964.
- Doblado, R., J. Frias, and C. Vidal-Valverde. 2007. Changes in vitamin C content and antioxidant activity of raw and germinated cowpea (*Vigna sinens* var Carilla) seeds induced by high pressure treatment. *Food Chem.* 101: 918-923.
- Dordević, T. M., S. S. Šiler-Marinković, and S. I. Dimitrijević-Branković. 2010. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chem.* 119: 957-963.
- Duenas, M., T. Hernandez, S. Robredo, G. Lamparski, I. Estrella, and R. Munoz. 2012. Bioactive phenolic compounds of soybean (*Glycine max* cv. Merit): Modifications by different microbiological fermentations. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 62: 241-250.
- FAO. 2013. Findings and Recommendations of the 2011 FAO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation in Human Nutrition. *In: Dietary Protein Quality Evaluation in Human Nutrition: Report of an FAO Expert Consultation.* FAO Food and Nutrition Paper 92. Food and Agriculture Organization United Nations, Rome, Italy. 67 p.
- Gan, R. Y., N. P. Shah, M. F. Wang, W. Y. Lui, and H. Corke. 2016. Fermentation alters antioxidant capacity and polyphenol distribution in selected edible legumes. *Int. J. Food Sci. Technol.* 51: 875-884.
- Griffin, D. H. 1994. *Fungal Physiology*, 2nd ed. John Wiley and Sons, New York, NY, USA. 468 p.
- Handa, C. L., U. R. Couto, A. H. Vicensoti, S. R. Georgetti, and E. I. Ida. 2014. Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce  $\beta$ -glucosidase for bioconversion into aglycones. *Food Chem.* 152: 56-65.
- Heimler, D., P. Vignolini, M. G. Dini, and A. Romani. 2005. Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L dry beans. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3053-3056.
- Hole, A. S., I. Rud, S. Grimmer, S. Sigl, J. Narvhus, and S. Sahlstrom. 2012. Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. *J. Agric. Food Chem.* 60: 6369-6375.
- Hsu, H. W., D. I. Vavak, I. D. Saterlee, and G. A. Miller. 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Sci.* 42: 1269-1273.
- Hur, S. J., S. Y. Lee, Y. C. Kin, I. Choi, and G. B. Kim. 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chem.* 160: 346-356.
- Huynh, N. T., J. Van-Camp, G. Smagghe, and K. Raes. 2014. Improved release and metabolism of flavonoids by steered fortificación de los alimentos a base de cereales para el consumo humano.
- Fin de la versión en Español—
- \*—
- fermentation processes: A review. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 19369-19388.
- Katina, K., A. Laitila, R. Juvonen, K. H. Liukkonen, S. Kariluoto, V. Piironen, R. Lindbergh, P. Armand P, and K. Poutanen. 2007. Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye. *Food Microbiol.* 24: 175-186.
- Lopez C. J., D. I. Sánchez M., and J. A. Rosas R. 2006. Analysis of free amino acids in fermented shrimp waste by high-performance liquid chromatograph. *J Chromatogr.* 1105: 106-110.
- López, S. J. L., C. J. A. Ruiz, G. J. J. Sánchez, and I. R. Lépiz. 2005. Adaptación climática de 25 especies de frijol silvestre (*Phaseolus* spp.) en la república mexicana. *Rev. Fitotec. Mex.* 28: 221-229.
- Madeira-Junior, J. V., C. Barroso-Teixeira, and G. Alves-Macedo. 2013. Biotransformation and bioconversion of phenolic compounds obtainment: An overview. *Cr. Rev. Biotechnol.* 35: 75-81.
- Miklas, N. P., and J. R. Stavely. 1998. Incomplete dominance of rust resistance in tepary bean. *Hort. Sci.* 33: 143-145.
- Niveditha, R., R. Vedavyas, and R. S. Kandikere. 2016. Improvement of nutritional qualities of fermented kernels of wild legume *Canavalia cathartica* by *Rhizopus oligosporus*. *Curr. Biochem. Eng.* 3: 128-138.
- Ou, B., M. Hampsch-Woodill, and R. L. Prior. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4619-4626.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237.
- Reyes B., M., E. Z. Reyes F., J. Lopez C., J. Milan C., G. Loarca P., and C. Reyes M. 2010. Physicochemical, nutritional and antioxidant activity properties of tempeh from common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Food Sci. Technol. Int.* 16: 427-434.
- Rochín M., J. J., L.M. Sánchez M., J. Milán C., R. Gutiérrez D., E. O. Cuevas R., S. Mora R., A. Valdez O., and C. Reyes M. 2015. Enhancement of nutritional properties, and antioxidant and antihypertensive potential of black common bean seeds by optimizing the solid state bioconversion process. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 66: 498-504.
- Salgado, M. O., H. F. Schwartz, M. A. Brick, and M. A. Pastor-Corrales. 1994. Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp *phaseoli* in tepary beans (*Phaseolus acutifolius*). *Plant Dis.* 78: 357-360.
- Sánchez M., L. M., E. O. Cuevas R., R. Gutiérrez D., A. E. Ayala R., A. Valdez O., J. Milán C., and C. Reyes M. 2014. Solid-state bioconversion of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Rhizopus oligosporus* to improve total phenolic content,



- antioxidant activity and hypoglycemic functionality. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 65: 558-564.
- Satterlee, L. D., J. G. Kendric, H. F. Marshall, D. K. Jewell, R. A. Alí, M. M. Heckman, H. Fred-Steinke, P. Larson, R.D. Phillips, G. Sarwar, and P. Slum. 1982. *In vitro* assay for predicting protein efficiency ratio as measured by rat bioassay: Collaborative. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 65: 798-809.
- Scheerens, J. C., A. M. Tinsley, F. R. Abbas, C. W. Weber, and J. W. Berry. 1983. The nutritional significance of tepary bean consumption. *Desert Plant* 5: 11-56.
- Schmidt, C. G., L. M. Gonçalves. L. Prietto, H. S. Hackbart, and E. B. Furlong. 2014. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. *Food Chem.* 146: 371-377.
- Sing, N. P., and A. Pratap. 2016. Food Legumes for Nutritional Security and Health Benefits. *In: Singh U., C. S. Prahara, S. S. Sing, and N. P. Singh (eds). Biofortification of Food Crops.* Springer. India. pp: 41-50. DOI 10.1007/978-81-322-2716-8\_4
- Singleton, V. L., R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzy.* 299: 152-178.
- Wang, Y. K., X. Zhang, G. L. Chen, J. Yu, L. Q. Yang, and Y. Q. Gao. 2016. Antioxidant property and their free, soluble conjugate and insoluble-bound phenolic contents in selected beans. *J. Func. Foods* 24: 359-372.
- Watanabe, N., K. Fujimoto, and H. Aoki. 2007. Antioxidant activities of the water-soluble fraction in tempeh-like fermented soybean. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 58: 577-587.
- Yoon, M. R., S. H. Nam, and M. U. Kang. 2008. Antioxidative and antimutagenic activities of 70 % ethanolic extracts from four fungal mycelia-fermented speciality rices. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 43: 118-125.

