



Original

Artículo español

Capacidad antibacteriana de fracciones peptídicas de frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) obtenidas por hidrólisis enzimática.

Antibacterial capacity of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) peptide fractions obtained by enzymatic hydrolysis.

Carlos Gasca-Tuz, Luis Chel-Guerrero, David Betancur-Ancona.

Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán. México.

Resumen

Objetivo. Evaluar la capacidad antibacteriana de fracciones peptídicas de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) obtenidas por hidrólisis enzimática.

Métodos. Se procesaron granos de *Phaseolus lunatus* para obtener concentrados proteínicos, los cuales fueron sometidos a hidrólisis enzimática con las enzimas pepsina, Flavourzyme^{MR} y el sistema secuencial pepsina-pancreatina. A los hidrolizados obtenidos se les evaluó el grado de hidrólisis y los que presentaron un valor menor a 10% se les evaluó la capacidad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*.

Resultados. Los grados de hidrólisis más bajos que se obtuvieron fueron: 8.48, 9.58 y 7.40% para los sistemas enzimáticos pepsina, Flavourzyme^{MR} y el sistema secuencial pepsina-pancreatina, respectivamente. Las fracciones peptídicas no presentaron una capacidad antibacteriana observable en forma de inhibición del crecimiento de las cepas.

Conclusión. Los hidrolizados proteínicos de *Phaseolus lunatus*, no presentaron capacidad antibacteriana contra las cepas estudiadas.

Palabras clave

Frijol lima; *Phaseolus lunatus*; hidrólisis enzimática; capacidad antibacteriana.

Abstract

Aim. The aim was to evaluate the antibacterial capacity from lima bean peptide fractions obtained by enzymatic hydrolysis.

Methods. *Phaseolus lunatus* beans were processed for obtain protein concentrates, which were subjected to enzymatic hydrolysis with pepsin, Flavourzyme and pepsin-pancreatin sequential system. The antibacterial ability against *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* was evaluated for protein hydrolysates with a value less than 10% of degree of hydrolysis

Results. The lower degrees of hydrolysis obtained were: 8.48, 9.58 and 7.40%, for pepsin, Flavourzyme and pepsin-pancreatin sequential system enzyme, respectively. Peptide fractions showed no observable antibacterial ability as growth inhibition of the strains.

Conclusion. *Phaseolus lunatus* protein hydrolysates showed no antibacterial capacity against the strains studied.

Keywords

Lima bean; *Phaseolus lunatus*; enzymatic hydrolysis; antibacterial capacity.

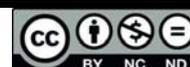
Aportación a la literatura científica:

Las actividades económicas globales de producción y consumo en los últimos años se han incrementado. Esto ha propiciado nuevas tendencias hacia el crecimiento económico sustentable tomando como base el uso de los recursos renovables. El uso de materias primas derivadas principalmente de plantas es una alternativa para su utilización como materiales multifuncionales. La especie *Phaseolus lunatus* L., también conocida como frijol Lima tiene semillas comestibles y ricas en proteínas y almidón. Sus proteínas han sido hidrolizadas para obtener fracciones o péptidos con actividad biológica. Los péptidos bioactivos son fragmentos de proteínas específicas que impactan positivamente en las funciones o condiciones del organismo y por ende podrían influenciar en la salud humana. Se han comprobado actividades antihipertensivas, antioxidantes, antitrombóticas y anticariogénicas *in vitro* del hidrolizado enzimático de frijol

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: bancona@correo.uady.mx (David Abram Betancur-Ancona).

Recibido el 29 de septiembre de 2016; aceptado el 7 de octubre de 2016.



Los artículos publicados en esta revista se distribuyen con la licencia:
Articles published in this journal are licensed with a:
Creative Commons Attribution 4.0.
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>
La revista no cobra tasas por el envío de trabajos,
ni tampoco cuotas por la publicación de sus artículos.

lima. Un grupo de péptidos activos comprende aquellos que tienen actividad antimicrobiana. Mezclas de fracciones peptídicas, poseen actividad antibacteriana contra los microorganismos como *S. flexneri*. Sin embargo, las fracciones peptídicas de *Phaseolus lunatus* no presentaron actividad contra *Escherichia coli*, *Salmonella tiphimurium* y *Staphylococcus aureus*.

Introducción:

Desde tiempos ancestrales las bacterias han causado diversas enfermedades en el ser humano las cuales se pueden clasificar en: infecciones cuando son provocadas por la acción directa de la bacteria o intoxicaciones cuando la enfermedad se debe a componentes producidos por la misma. En el área de la salud, las enfermedades alimentarias son muy comunes, por lo cual se empezó a implementar el uso de sustancias con la capacidad de inhibir o controlar el crecimiento de microorganismos. Estas sustancias son utilizadas como aditivos en los alimentos procesados o en los empaques de los mismos, para evitar infecciones o intoxicaciones microbianas¹. El uso irracional de estos compuestos ha generado un gran problema debido a la aparición de cepas resistentes a agentes antimicrobianos, así como a la aparición de toxicidad por su empleo en altas concentraciones o también por alterar la estructura química de los alimentos². Una alternativa a estos inconvenientes podría ser la utilización de fracciones peptídicas o péptidos bioactivos que representan una forma amplia de defensa natural contra diversos microorganismos conocidos³.

Los péptidos bioactivos son fragmentos de proteínas específicos que impactan positivamente en las funciones o condiciones del cuerpo humano y por último podrían influenciar en la salud. Un grupo de péptidos bioactivos comprende aquellos que tienen actividad antimicrobiana. Algunas aplicaciones novedosas e importantes se han desarrollado en la agricultura, como conservantes en alimentos y en medicina⁴.

Los péptidos antibacterianos son moléculas catiónicas que están presentes en plantas, insectos, animales e inclusive peces. Generalmente estos péptidos contienen entre 15 y 200 aminoácidos y su peso molecular usualmente es menor a 10 kDa. También estos péptidos exhiben cierta selectividad sobre las bacterias Gram negativas, esto debido a los componentes que forman parte de la membrana celular de este grupo de bacterias⁵. Algunas familias de péptidos antimicrobianos se han identificado en plantas y en general presentan un tamaño que va de 2 a 9 kDa. Todos los péptidos antimicrobianos provenientes de plantas son globulares, compactos y ricos en el aminoácido cisteína. Sin embargo, las tioninas fueron los primeros péptidos aislados de plantas en ser descritos. Subsecuentemente, la actividad antimicrobiana ha sido identificada en varias defensinas, proteínas de transferencia lipídica, péptidos de heveína y knottin, incluyendo MBP-1 del maíz, IbAMP de semillas de flores de alegría (*Impatiens sultanii*), snakin de papas, y seferdinas de las raíces de la planta bolsa de pastor (*Capsella bursa-pastoris*). Otra de las funciones de los péptidos antimicrobianos en la piel humana es la de proteger contra un extenso número de patógenos. Los péptidos antimicrobianos producidos por la piel del epitelio proveen un campo amplio contra los microbios patógenos⁶.

La especie *Phaseolus lunatus* L., pertenece a la familia Fabaceae, la cual es una de las más grandes entre las dicotiledóneas, con 643 géneros y reúne 18.000 especies distribuidas en todo el mundo, éstas se concentran en las regiones tropicales y subtropicales. La especie *Phaseolus lunatus* L., también conocida como habas o frijoles de lima, se cultiva en América del Norte, América del Sur, Europa, África oriental y occidental y el sudeste de Asia. Las semillas son comestibles y ricas en proteínas (240 g kg⁻¹) y almidón (630 g kg⁻¹)⁷.

La actividad biológica de los péptidos obtenidos de la hidrólisis del concentrado proteico de esta especie han sido estudiados. Por ejemplo, se ha comprobado la actividad antitrombótica *in vitro* en un porcentaje del 100 % en una concentración de 6.15 mg/mL del hidrolizado con pepsina. Así mismo, se reportó la actividad anticariogénica al funcionalizar el mismo hidrolizado con pirofosfato y logrando reducir la disociación del calcio en un 77.3% y del fósforo en un 76.9 %⁸. De manera similar, las mezclas de polipéptidos y péptidos de bajo peso molecular, han sido asociados a la capacidad antioxidante e inhibición de la enzima convertidora de angiotensina⁷.

El presente trabajo tiene como objetivos evaluar el efecto del tiempo de reacción y relación enzima sustrato sobre el grado de hidrólisis de concentrados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) y determinar la actividad antibacteriana de las fracciones peptídicas obtenidas.

Métodos:

Obtención del concentrado proteínico (CP) de frijol lima.

Se utilizó el método reportado por Chel-Guerrero *et al.*,⁹. Se preparó una dispersión de harina/agua en una relación 1:6 (p/v), el pH se ajustó a 11 con una solución de NaOH 1 N y se agitó por 1 h a 400 rpm con ayuda de un agitador mecánico (Caframo RZR-1). Posteriormente la suspensión se pasó a través de dos tamices: malla 80 (177 µm) y 100 (147 µm) secuencialmente para separar el bagazo (rico en fibra) de la mezcla de almidón y proteína. El residuo sólido se lavó en tres ocasiones con agua destilada y el filtrado se recibió en un recipiente de plástico y se dejó reposar durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reposo, se decantó el sobrenadante (proteína en solución), para separar el sedimento rico en almidón. Al sobrenadante se le ajustó el pH a 4.5 con HCl 1 N, y se centrifugó a 1317 x g por 12 min (centrífuga Mistral 3000i) para recuperar el precipitado, el cual se secó a -45°C y 133 x 10⁻³ mbar en una liofilizadora Labconco Freezone.

Composición proximal.

Se realizó el análisis de la composición proximal a la harina y concentrado proteínico de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) de acuerdo a los procedimientos oficiales de la Association of Official Agricultural Chemists¹⁰. El nitrógeno se

determinó con un sistema Kjeltex (Tecator, Sweden) y el contenido de proteína se calculó como nitrógeno por 6.25 (método 954.01); la grasa se cuantificó a partir de la extracción con hexano durante 1h (método 920.39); las cenizas se calcularon como el peso remanente después de calcinar la muestra en una mufla a 550°C durante 4 h (método 923.03); la humedad se determinó por la pérdida de peso después de secar la muestra a 110°C por 4 h (método 925.09); la fibra cruda se calculó como el residuo orgánico combustible e insoluble que se obtiene después de digestión ácida y alcalina (método 962.09) y los carbohidratos se estimaron por diferencia como el extracto libre de nitrógeno (E.L.N.).

Hidrólisis enzimática limitada de frijol lima.

La obtención del hidrolizado proteínico se realizó de acuerdo a un diseño factorial 2^2 con cuatro con 4 puntos centrales en una distribución en tres bloques al azar, en donde los bloques fueron los sistemas enzimáticos empleados (Pepsina, la enzima comercial Flavourzyme^{MR} y el tratamiento secuencial con Pepsina-Pancreatina). Los factores principales y niveles que se evaluaron fueron el tiempo de reacción (10 - 60 min), la relación enzima sustrato (1:10 y 1:50 p/p) y la variable respuesta fue el grado de hidrólisis. La hidrólisis con pepsina (HP), y secuencial pepsina-pancreatina (HPP) se realizó de acuerdo a los métodos reportados por Domínguez-Magaña *et al.*,¹¹. Se prepararon suspensiones proteínicas al 4% p/v con relación al contenido de proteína presente en el concentrado, y se mantuvieron a 37°C en un baño con agitación constante. Posteriormente, la suspensión se ajustó a pH 2 con HCl 1N, y se adicionó la enzima pepsina en una relación 1:10 ó 1:50 p/p de acuerdo al diseño experimental. Para el tratamiento secuencial, la reacción enzimática se realizó con pepsina durante la mitad del tiempo de hidrólisis establecido en el diseño experimental y posteriormente se detuvo la reacción mediante un ajuste de la suspensión a pH 7.5 con NaOH 1N. Se procedió a la segunda digestión con pancreatina en una relación 1:10 ó 1:50 p/p, a la misma temperatura (37°C) y a pH 7.5 durante la segunda mitad del tiempo de hidrólisis. En la hidrólisis con la enzima comercial Flavourzyme^{MR} (HF) se utilizó el método descrito por Pedroche *et al.*,¹² con algunas modificaciones, en donde las suspensiones de concentrado proteínico se prepararon a una concentración de 4% p/v y una proporción de enzima sustrato de 1:50 ó 1:10 p/v y se emplearon 50, 30 y 10 LAPU·g⁻¹ de sustrato, de acuerdo al diseño experimental a un pH 7 y a una temperatura de 50°C. La reacción enzimática se interrumpió mediante calentamiento de la suspensión proteínica a 80°C durante 20 min. Los hidrolizados se centrifugaron en una ultracentrifuga Beckman LE-80K a 16211 x g durante 30 min a 4°C y el sobrenadante se mantuvo en congelación para luego ser liofilizado a -47°C y 13x10⁻³mbar. Se determinó el grado de hidrólisis (GH) de los hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) de acuerdo a Nielsen *et al.*,¹³.

Fraccionamiento y determinación cuantitativa de proteína.

Se tomaron los sobrenadante previamente obtenidos de los hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y se fraccionaron a través de ultrafiltración utilizando una membrana con un corte de peso molecular de 10 kDa. Se colectaron dos fracciones de manera separada: la retenida >10 kDa y la permeada < 10 kDa.. Las fracciones se liofilizaron a -47°C y 13x10⁻³ mbar en un liofilizador Labconco y se les determinó el contenido de proteína mediante el método de Lowry *et al.*,¹⁴. En un tubo de ensayo se colocaron 100 µL de muestra diluida (10 µL de muestra en 1 mL de agua destilada) y se añadieron 100 µL de hidróxido de sodio 2N, se homogenizó el contenido mediante agitación en vortex durante 30 s y se calentó el tubo en un baño a 100°C durante 10 min. Se retiró el tubo del baño y se dejó enfriar durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregó 1 mL de reactivo complejo, preparado con carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 2.0%, sulfato cúprico (CuSO₄·4H₂O) al 1% y tartrato de sodio y potasio (C₄H₄KNaO₆·4H₂O) al 2%, en relación 100:1:1 (v/v/v). Se homogenizó el contenido mediante agitación en vortex durante 30 s y se colocó en la obscuridad durante 10 min a temperatura ambiente. Después se agregaron 100 µL de reactivo Folin-Ciocalteu al 50%, se homogenizó el contenido mediante agitación en vortex durante 30 s, se colocó en la obscuridad durante 45 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 750 nm. La cuantificación se hizo mediante una recta de calibrado preparada a partir de una solución de 1 mg·mL⁻¹ de seroalbúmina bovina (BSA).

Capacidad antibacterial.

Para esta actividad se utilizó la parte soluble de los hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) que presentaron un grado de hidrólisis bajo, la cual fue fraccionada en <10 KDa y >10 KDa y a la que también se le determinó la cantidad de proteína presente. La metodología empleada fue la propuesta por Chim-Chi *et al.*,¹⁵ se emplearon 3 cepas patógenas: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella tiphimurium* y *Escherichia coli*. Primero se sembraron las cepas en tubos con rosca de 50 mL, cada cepa con 5 mL de caldo nutritivo, se incubaron a 37°C y 150 rpm durante 24 h en una incubadora Lab-line Orbit. Posteriormente, los caldos se diluyeron hasta una concentración de 1x10⁵ unidades formadoras de colonias por ml (ufc·mL⁻¹). Para el conteo de ufc·mL⁻¹ de cada cepa se aplicó la técnica de la gota¹⁶. En cajas de petri estériles se colocaron 5 cilindros de borosilicato con un diámetro externo de 7 mm a las cuales se les agregaron 25 mL de agar Mueller Hinton previamente esterilizado. Una vez gelificado el agar, se retiraron los cilindros formadores de los pozos. Las cajas se colocaron a 37°C en una incubadora Quincy Lab R-104E, para la prueba de esterilidad durante 24 h. Después se depositaron 100 µL del hidrolizado proteínico con bajo grado de hidrólisis diluido en agua destilada estéril con concentraciones diferentes de proteína (50, 60 y 70 mg·mL⁻¹) en tres pozos y en los restantes se colocaron 100 µL de una solución de Amikacina (1.25 mgmL⁻¹) como control positivo y 100 µL de agua estéril como control negativo. Posteriormente las cajas se incubaron a 4°C durante 1 h, se atemperaron y se

procedió a inocular las cepas con un hisopo estéril. Finalmente, las cajas fueron incubadas a 37°C durante 24 h. Las zonas de inhibición se observaron directamente en la caja de petri con ayuda de un contador de colonias y fueron medidas con la ayuda de un vernier. La lectura se tomó atravesando el centro de la misma a fin de incluir el diámetro del pozo, reportándose como la inhibición en mm.

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron procesados mediante estadística descriptiva, utilizando medidas de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar). En la resolución de los diseños experimentales se empleó el software Statgraphics XV Centurión, en donde se realizó análisis de varianza y regresión lineal para determinar cuál de los dos factores estudiados presentaron influencia sobre la variable respuesta, así como una comparación de medias a través de la prueba de Tukey¹⁷.

Resultados:

Composición proximal de harina y concentrado proteínico de *Phaseolus lunatus*.

La composición proximal tanto de la harina como del concentrado proteínico del frijol lima se muestran en la tabla I. Se puede observar que el nivel de humedad en la harina de *Phaseolus lunatus* (HaP) fue bajo a comparación con el concentrado proteínico (CP) de la misma leguminosa lo cual puede deberse al hecho de la naturaleza hidrofílica de las proteínas, ya que diferencias microestructurales entre los componentes hacen que sean más o menos capaces de retener moléculas de agua¹⁸.

Componente (%)	Harina de <i>Phaseolus lunatus</i>	Concentrado proteínico de <i>Phaseolus lunatus</i>
Humedad	(4.70) ^b	(9.97) ^a
Proteína cruda	19.61 ^b	71.11 ^a
Fibra cruda	2.38 ^a	0.59
Grasa cruda	1.06 ^b	3.72 ^a
Cenizas	2.70 ^b	4.21 ^a
E.L.N ²	74.25 ^a	20.37 ^b

¹ Los datos provienen de tres repeticiones. ²ELN: Extracto libre de nitrógeno, calculado por diferencia a los demás componentes. ^{a-b}Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa (p<0.05).

Hidrólisis enzimática y grado de hidrólisis.

Los grados de hidrólisis (GH) más bajos de los concentrados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) que se obtuvieron fueron: 8.48, 9.58 y 7.40% para los sistemas enzimáticos pepsina (HP), Flavourzyme^{MR} (HF) y el sistema secuencial pepsina-pancreatina (HPP), respectivamente (Tabla II). El GH es la propiedad fundamental que va a determinar en gran medida las características que el hidrolizado va a presentar y su posible uso¹⁹. También es de importancia mencionar que el GH es una medida de la magnitud de la degradación hidrolítica de una proteína¹³. Es esto quiere decir, que es el grado de modificación estructural que tiene una proteína nativa con la consecuente generación de nuevos péptidos de menor peso molecular.

Tratamiento	Factor A Relación E/S	Factor B Tiempo (min)	GH% Pepsina	GH% Flavourzyme	GH% Pepsina-Pancreatina
1	1:50	10	8.48±0.40	9.58±0.25	7.4±0.85
2	1:10	10	14.28±0.06	14.57±0.10	16.54±0.54
3	1:50	60	12.59±0.19	12.03±1.42	15.89±0.36
4	1:10	60	15.08±0.16	25.14±2.92	20.54±0.50
0	1:30	35	14.07±0.02	13.23±0.56	14.97±0.28
0	1:30	35	17.18±0.27	16.44±0.18	13.83±0.29
0	1:30	35	14.19±0.46	12.46±0.08	15.04±0.37
0	1:30	35	13.49±0.39	16.07±0.10	13.51±0.71

Al realizarse el análisis estadístico al diseño planteado se halló que los dos factores principales factor A: relación E/S y factor B: tiempo de hidrólisis tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$), así como también la interacción de los factores: relación E/S-tiempo de hidrólisis, siendo el primer factor el que más impacto presentó sobre la respuesta (GH). El modelo matemático polinomial de primer orden que explica este comportamiento fue el siguiente:

$$\% \text{ GH} = 14.4417 + 3.3483 \text{ A} + 2.5350 \text{ B} + 0.0266 \text{ AB}$$

El nivel inferior de cada factor fue codificado con -1 y el nivel superior con +1. El modelo matemático permitió establecer que el GH está en función de la relación enzima sustrato que se utilice así como del tiempo que dure la hidrólisis y de la interacción de estos dos factores, con un coeficiente de determinación R^2 de 0.7321, esto quiere decir que el modelo explica el 73.2% del comportamiento de los datos.

Determinación de proteína en las fracciones peptídicas del hidrolizado proteínico.

De los hidrolizados limitados obtenidos, el sobrenadante se fraccionó por medio de ultrafiltración y se generaron dos fracciones: una menor a 10 kDa y una mayor 10 kDa (Figura I). El motivo por el cual se empleó la separación en fracciones peptídicas es que los péptidos con actividad antibacteriana generalmente presentan un peso molecular menor a 10 kDa⁵.

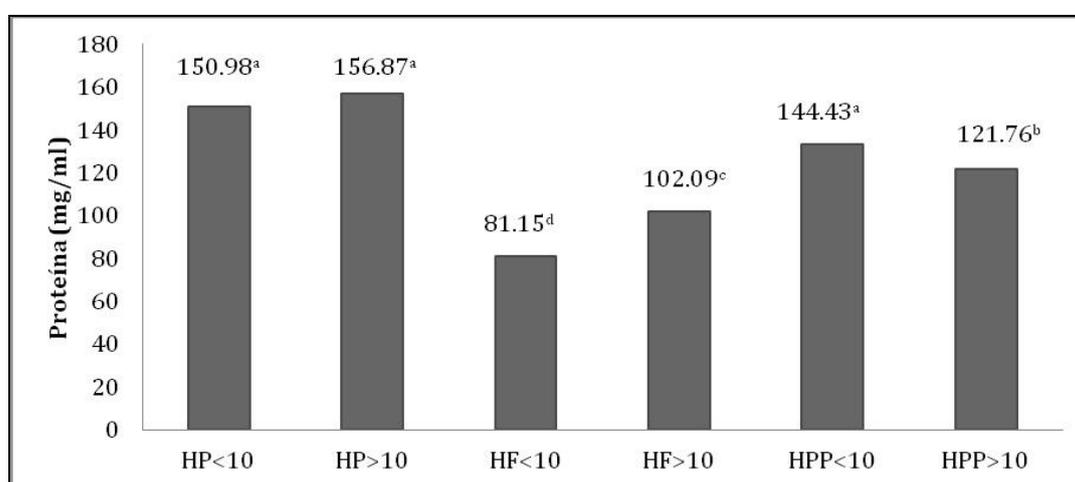


Figura I. Contenido de proteína de las fracciones peptídicas de los sobrenadantes de los hidrolizados limitados de *Phaseolus lunatus* (HP, HF y HPP). ^{a-c}Letras diferentes de la fracción que proviene del mismo sistema enzimático indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Como se puede observar en la figura anterior para HP sus fracciones fueron iguales de manera significativa ($p < 0.05$), en cuanto a HF de sus dos fracciones la que fue > 10 kDa presentó mayor cantidad de proteína de manera significativa a diferencia de la de < 10 kDa ($p < 0.05$), lo cual pudo deberse al grado de hidrólisis limitado, ya que los péptidos que se liberaron durante la hidrólisis fueron muy grandes. A diferencia en HPP que presentó una fracción < 10 kDa mayor que a la fracción > 10 kDa.

Evaluación de la capacidad antibacteriana.

Se determinó el efecto inhibitorio de las fracciones < 10 kDa y > 10 kDa de los hidrolizados de proteína limitados HP, HF y HPP sobre el crecimiento bacteriano, ya que de acuerdo a la literatura las fracciones menores de 10 kDa presentarían dicha bioactividad. Los resultados de la capacidad antibacteriana de las fracciones de los tres hidrolizados proteínicos HP, HF y HPP se presentan en las Figuras II, III y IV contra bacterias que causan patologías relacionadas a los alimentos como son: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*.

Las fracciones peptídicas fueron probadas frente a *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* y no presentaron una capacidad antibacteriana observable en mm de inhibición frente a las cepas antes mencionadas. Resultados similares fueron reportados por Marrufo-Estrada *et al.*,²⁰ que empleando solo hidrolizados proteínicos de *Jatropha curcas* L. con grados de hidrólisis altos (10.4, 10.6, y 11.5% con alcalasa y 19.3, 18.8 y 19% secuencial pepsina-pancreatina) frente a *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus agalactiae* y por Chim-Chi *et al.*,¹⁵ utilizando hidrolizados de proteína de *Jatropha curcas* L. (GH de 27.36 y 33.24%) y *Vigna unguiculata* (GH de 30.31 y 46.41%), estos autores indicaron la ausencia de capacidad antibacteriana de los hidrolizados proteínicos que obtuvieron debido a los altos GH que alcanzaron.

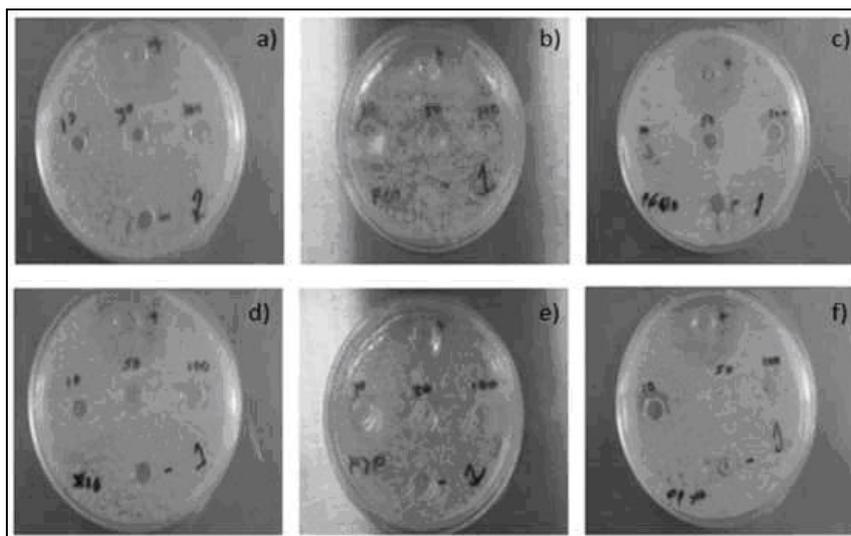


Figura II. Capacidad antibacteriana de los hidrolizados proteínicos HP, HF y HPP contra *E. coli* (a, b y c menores de 10 kDa; d, e, y f mayores de 10kDa).

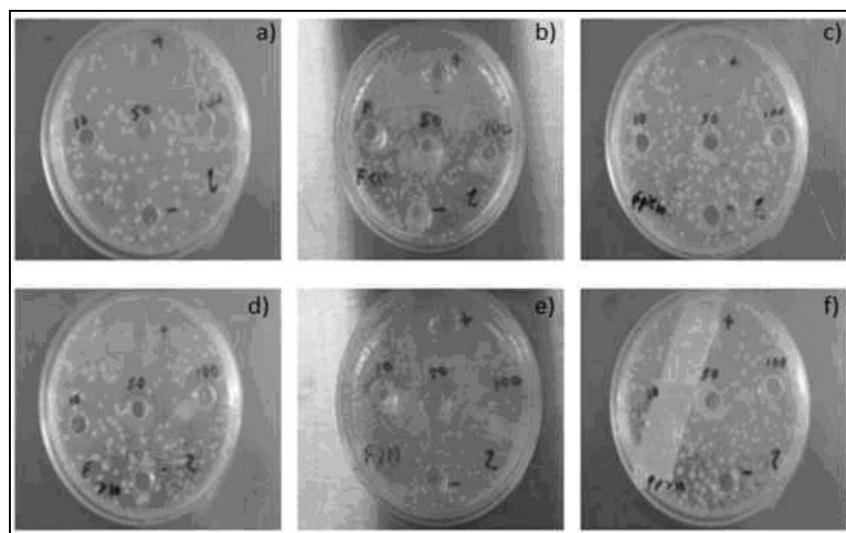


Figura III. Capacidad antibacteriana de los hidrolizados proteínicos HP, HF y HPP contra *S. typhimurium* (a, b y c menores de 10 kDa; d, e, y f mayores de 10kDa).

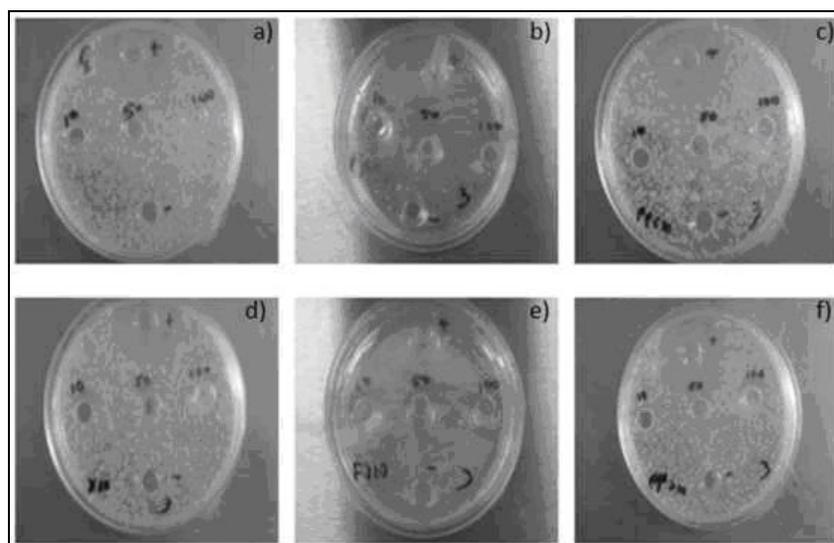


Figura IV. Capacidad antibacteriana de los hidrolizados proteínicos HP, HF y HPP contra *S. aureus* (a, b y c menores de 10 kDa; d, e, y f mayores de 10kDa).

Discusión:

El contenido de proteína de la harina y concentrado proteínico fue de 19.60 y 71.11%, respectivamente. Chel-Guerrero *et al.*,⁹ obtuvieron valores de contenido de proteína en harina y concentrado proteínico de *Canavalia ensiformis*

con 26.86 y 73.75%, respectivamente, siendo el contenido de proteína similar al encontrado en el concentrado proteínico de *Phaseolus lunatus* (71.11%). Este valor fue semejante al reportado por Betancur-Ancona *et al.*, (69.9 %), pero ligeramente menor al hallado por Polanco *et al.*, (2014) con 72.01 %. Domínguez-Magaña *et al.*,¹¹ utilizando la misma leguminosa encontró valores de proteína cruda de 30.18 y 56.40% para harina y concentrado proteínico, respectivamente, que fueron obtenidos de granos sin germinar al igual que con los granos con los que se trabajaron en el presente trabajo.

La variabilidad en contenidos de proteína que existió, pudo deberse a la composición original de la materia prima y al método de preparación empleado en la extracción proteínica. En el contenido de grasa cruda, se observó un incremento en el CP (3.72%) pero este fue menor comparado con el reportado por Chel-Guerrero *et al.*,⁹ para *C. ensiformis* (5.12%). Por otro lado, Corzo-Ríos *et al.*,²¹ reportan un incremento en el contenido graso del CP (19.26%) de *Mucuna pruriens* en comparación con la harina (2.83%). El aumento del contenido graso en el concentrado proteínico puede deberse a la asociación de los lípidos con las proteínas que se produce durante su obtención, en donde se ve favorecida esta unión por la desnaturalización de las proteínas durante el proceso, esto debido a la exposición de aminoácidos hidrofóbicos ocultos en la proteína nativa que posteriormente se asocian con las cadenas alifáticas de los lípidos. La disminución en la fibra cruda y el ELN en el CP, 0.59 y 20.37%, respectivamente, en comparación con la HP (2.38 y 74.26%, respectivamente) se le puede atribuir al método de fraccionamiento húmedo donde se separó la fibra cruda a través de un tamizado secuencial y el ELN por la sedimentación del almidón²².

La hidrólisis con la enzima pepsina dio valores de GH entre 8.48 y 17.18%. Esta enzima es una proteasa aspártica y tiene una especificidad hacia el carbono terminal de los residuos de tirosina, fenilalanina y triptófano y también es una endopeptidasa. El GH más alto que se obtuvo, está de acuerdo a lo encontrado por Tsumura *et al.*,²³ utilizando la enzima pepsina en una relación 1:40 E/S y 30 min que obtuvieron hidrolizados del componente glicinina de la soja con un GH de 15%. Por otra parte, Paraman *et al.*,²⁴ reportan valores de GH menores al 10% utilizando esta enzima durante diferentes tiempos hasta 75 min. También Megías *et al.*,²⁵ obtuvieron un GH de 15.5% después de 3 h con una relación E/S de 1:20. En comparación con los otros sistemas enzimáticos, al emplear solo la enzima pepsina se lograron valores de GH que no sobrepasaron el 18% lo cual puede atribuirse tanto a la actividad catalítica como a la especificidad que exhibe hacia el sustrato. La enzima Flavourzyme^{MR} es de origen microbiano y es muy utilizada para mejorar las propiedades funcionales y nutrimentales de preparaciones proteínicas y su actividad catalítica es una mezcla de endo y exopeptidasa. En cuanto a esta enzima, los valores de GH que se obtuvieron oscilaron entre 9.58 y 25.14%. En comparación a los resultados obtenidos, estos fueron mayores al valor reportado por Betancur-Ancona *et al.*,¹⁸ con un GH de 7.7% quienes emplearon una relación 1:200 E/S y un tiempo de 60 min utilizando proteína de *P. lunatus* como sustrato.

En el sistema enzimático secuencial pepsina-pancreatina, estas son proteasas liberadas durante la digestión, la primera es generada en el estómago y la segunda incluye otras proteasas tales como la tripsina, quimiotripsina, elastasa que son liberadas por el páncreas en el intestino delgado²⁵, la tripsina tiene especificidad sobre lisina y arginina; la quimiotripsina sobre triptófano, fenilalanina y tirosina y por último la elastasa sobre glicina y alanina. El valor más bajo y más alto de GH empleando este sistema secuencial fueron de 7.40 y 20.54%, respectivamente, por lo que son menores a lo reportado por Chim-Chi *et al.*, (2013)¹⁵ que utilizando este sistema enzimático secuencial pepsina-pancreatina obtuvo valores de GH entre 22.71 y 34.47%, en tiempos que van desde 30 min hasta 120 min con una relación E/S 1:10 para *Jatropha curcas* y también valores entre 33.71 y 47.69% a las mismas condiciones con *Vigna unguiculata*. Domínguez-Magaña *et al.*,¹¹ obtuvo valores de GH con este mismo sistema secuencial que oscilaron entre 15.35 y 37.07% en tiempos que van desde 60 hasta 180 min con una relación de E/S 1:50 y 1:10, respectivamente. Los hidrolizados de proteína producidos por este sistema enzimático secuencial pueden ser fácilmente asimilados por el organismo y también si estos generaran alguna bioactividad no se verían afectados debido a que son factibles de presentarse durante la digestión, y la variación en los GHs puede deberse a la acción conjunta de las dos enzimas empleadas que generaron una amplia diversidad de péptidos y polipéptidos, también es de notarse que con este sistema se produjo el más bajo GH entre las enzimas empleadas que puede atribuírsele al tiempo de hidrólisis ya que fue un periodo realmente corto (5 min por enzima) que influyó en el grado de hidrólisis final. Por lo anterior, se observa que la relación enzima-sustrato y el tiempo durante el cual se realiza la hidrólisis son factores claves que afectan significativamente el GH final. Los grados de hidrólisis (8.48, 9.58 y 7.40% para HP, HF y HPP, respectivamente) indican la presencia de polipéptidos e incluso la posibilidad de proteínas nativas, por lo tanto, los hidrolizados de proteína obtenidos podrían tener aplicaciones tecnofuncionales. Estos resultados indican que la incorporación de estos hidrolizados en la formulación de alimentos sería algo beneficioso no solo porque serían una buena fuente de nitrógeno y aminoácidos al cuerpo, sino porque son una buena fuente alterna de proteínas frente a las proteínas de origen animal que han venido incrementado sus costos.

Aunque todos los hidrolizados fraccionados eran limitados, la variación en el comportamiento en cuanto al contenido de proteína determinado en las fracciones se le puede atribuir a la formación de péptidos de diferentes tamaños e incluso aminoácidos libres después de la hidrólisis parcial, que es notorio en el caso de HPP ya que presento una fracción <10 kDa mayor que su fracción >10 kDa. Así también, a pesar de que HF presentó el GH más alto de los tres hidrolizados proteínicos el comportamiento que presenta puede atribuírsele a la variación en el contenido de tirosina de los péptidos. La ultrafiltración es una herramienta para refinar los hidrolizados e incrementar su actividad específica en la perspectiva de la modernización de la industria de los subproductos para producir ingredientes bioactivos para alimentación humana y animal por lo que el fraccionamiento de acuerdo a los pesos moleculares es una buena alternativa para depurar péptidos e incrementar sus propiedades bioactivas²⁶.

Son pocos los trabajos sobre la obtención de péptidos antibacterianos a través de hidrólisis enzimática de origen

vegetal; sin embargo, se ha encontrado actividad antibacterial utilizando hidrolizados de proteína de pasta de la palma Kernel frente a *Bacillus cereus* en donde usaron sistemas enzimáticos de pepsina y tripsina. También utilizando *Brucea amarissima* encontraron y aislaron un péptido con actividad contra bacterias Gram- negativas y Gram-positivas después de una hidrólisis con pepsina²⁷. Una explicación para la ausencia de efecto inhibitorio en esta prueba pudo deberse al GH de los hidrolizados proteínicos utilizados para esta bioactividad (GH de 8.48 para HP, 9.58 para HF y 7.40 % para HPP) ya que entre menor sea este suele obtenerse una mayor actividad frente a los microorganismos, lo cual se viene a confirmar con lo recientemente reportado por Bojórquez-Balam *et al.* (2013)²⁸ quienes obtuvieron un hidrolizado proteínico de *Phaseolus lunatus* con capacidad antibacterial contra *S. aureus* y *S. flexneri* y el cual presentaba un GH de 5.5% que fue menor al obtenido en este estudio.

Conclusión:

Se obtuvieron fracciones peptídicas a partir de la hidrólisis enzimática del concentrado proteínico de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) con las enzimas pepsina, Flavourzyme^{MR} y secuencial pepsina-pancreatina con grados de hidrólisis de 8.48, 9.58 y 7.40%, respectivamente. A pesar de ser hidrolizados limitados no presentaron capacidad antibacterial contra *Escherichia coli*, *Salmonella tiphimurium* y *Staphylococcus aureus*.

Fuentes de Apoyo:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México)

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflicto de interés

Referencias

1. Rodriguez D, Schöbitz R. Film antimicrobial bases whey protein, lactic acid bacteria incorporated as controller *Listeria monocytogenes* applied to smoked salmon. *Fac. Cienc. Agrop.* 2009; 7 (2):49-54.
2. Davison PM, Harrison MA. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers and other. *Food Technol.* 2002; 56 (11):69-78.
3. Gutiérrez P, Orduz S. Péptidos antimicrobianos: estructura, función y aplicaciones. *Act. Biol.* 2003; 25 (78):5-15.
4. Mine Y, Shahidi F. Nutraceutical proteins and peptides in health and disease: An overview. En *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*; Mine, Y., Shahidi, F., Eds; Taylor & Francis group, 2006; pp. 4-25
5. Rydlo T, Miltz J, Mor A. Eukaryotic antimicrobial peptides: Promises and premises in food safety. *J. Food Sci.* 2006; 71 (9):125-135.
6. Imran M, Revol-Junelles A, René N, Jamshidian M, Akhtar MJ, Arab-Tehrany E, Jacquot M, Stéphane-Desobry S. Microstructure and physico-chemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films. *Food Hydrocoll.* 2012;29: 407-419.
7. Polanco E, Dávila-Ortiz G, Betancur-Ancona D, Chel-Guerrero L. Effects of sequential enzymatic hydrolysis on structural, bioactive and functional properties of *Phaseolus lunatus* protein isolate. *Food Sci. Technol.* 2014; 34 (3):441-448.
8. Córdova-Lizama A, Ruiz-Ruiz J, Segura-Campos M, Betancur-Ancona D, Chel-Guerrero L. Actividad antitrombótica y anticariogénica de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). En *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias*, Segura Campos, M., Betancur Ancona, D. Chel Guerrero, L. Eds.; Omnia Science, 2013; pp. 123-137.
9. Chel-Guerrero L, Pérez-Flores V, Betancur-Ancona D, Dávila-Ortiz G. Functional Properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds, *J. of Agric. Food Chem.* 2002; 50: 584-591.
10. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1997). *Methods of analysis of association of official analytical chemists.* 16 th Edition Washington, D.C.
11. Domínguez-Magaña M, Segura-Campos M, Dávila-Ortiz G, Betancur-Ancona D, Chel-Guerrero L. ACE-I inhibitory properties of hydrolysates from germinated and ungerminated *Phaseolus lunatus* proteins, *Food Sci. Technol.* 2015; 35 (1):167-174.
12. Pedroche J, Yust MM, Girón-Calle J, Alaiz M, Millán F, Vioque, J. Utilisation of Chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin-I converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *J. Sci. Food Agric.* 2002; 82: 960-965.
13. Nielsen P, Petersen D, Dambmann C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J. Food Sci. Food Chem. Toxicol.* 2001; 66 (5):642-646.
14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. of Biol. Chem.* 1951; 193:267-275
15. Chim-Chi Chim YA, Martínez AA, Chel-Guerrero L. Caracterización de hidrolizados de *Jatropha curcas* y *Vigna unguiculata*. EAE Editorial Academia Espanola, USA 2013
16. Corona A, Jiménez R. Comparación de dos métodos de siembra para el recuento de microorganismos en

- muestras con alta concentración microbiana. Rev. Fac. Ing. Quím. 2004; 40:3-7.
17. Montgomery, D. C. Diseño y análisis de experimentos. 2da Ed. Editorial Limusa. México, D. F. 2006.
 18. Betancur-Ancona D, Martínez-Rosado R, Corona-Cruz A, Castellanos-Ruelas A, Jaramillo-Flores M, Chel-Guerrero L. Functional properties of hydrolysates from *Phaseolus lunatus* seeds. Int. J. Food Sci. Technol. 2009; 44 (1): 128-137.
 19. Benítez R, Ibarz A, Pagan J. Hidrolizados de proteína: Procesos y aplicaciones. Acta Bioq. Clin. Lat. 2008; 42 (2):227-236.
 20. Marrufo-Estrada DM, Segura-Campos MR, Chel-Guerrero LA., Betancur-Ancona DA. Defatted *Jatropha curcas* flour and protein isolate as materials for protein hydrolysates with biological activity. Food Chem. 2013; 138:77-83.
 21. Corzo-Ríos L, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. Extracción de las fracciones de almidón y proteína del grano de la leguminosa *Mucuna pruriens*. Technol. Cienc. Educ. 2000; 15 (1):37-41.
 22. Betancur-Ancona D, Gallegos-Tintore S, Chel-Guerrero, L. Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. J. Sci. Food Agric. 2004; 84: 1193-1201.
 23. Tsumura K, Saito T, Tsuge K, Ashida H, Kugimiya W, Inouye K. Functional properties of soy hydrolysates obtained by selective proteolysis. LWT-Food Sci Tech. 2005; 38: 255-261.
 24. Paraman I, Hettiarachchy NS, Schaefer C, Beck MI. Hydrophobicity, solubility and emulsifying properties of enzyme-modified rice endosperm protein. Cereal Chem. 2007; 84(4): 343-349.
 25. Megías C, Pedroche J, Yust MM, Alaiz M, Girón-Calle, J. Millán F, Vioque J. Sunflower protein hydrolysates reduce cholesterol micellar solubility. Plants Foods Hum. Nutr. 2009; 64: 86-93.
 26. Picot L, Ravallec R, Fouchereu-Péron M, Vandanjon L, Jaouen P, Chaplain-Derouiniot M, Guérard F, Chabeaud A, LeGal Y, Martinez O, Bergé JP, Piot J, M., Batista I, Pires C, Thorkelsson G, Delannoy C, Jakobsen G, Johansson I, Bourseau P. Impact of ultrafiltration and nanoiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. J. Sci. Food and Agric. 2010; 90 (11): 1819-1826
 27. Sornwatana T, Roytrakul S, Wetprasit N, Ratanapo S. A new antimicrobial peptide from digestion of *Brucea amarissima* Desv fruit protein. 36th Congress on Science and Technology of Thailand. 2010; pp. 1-4.
 28. Bojórquez-Balam E, Ruiz-Ruiz J, Segura-Campos M, Betancur-Ancona D, Chel-Guerrero L. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de fracciones peptídicas de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). M. Segura-Campos, L. Chel Guerrero, D. Betancur Ancona (Eds.), Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Barcelona: OmniaScience. 2013; pp. 139-154.