



Original

Artículo español

Actividad antimicrobiana de fracciones peptídicas de *Mucuna pruriens* contra *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*.

Antimicrobial activity of peptide fractions from *Mucuna pruriens* against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*.

Alfredo Benjamín Fuentes-Ortiz¹, Jorge Carlos Ruiz-Ruiz², Maira Rubí Segura-Campos¹

¹Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico Norte Km. 33.5, Tablaje Catastral 13615, Col. Chuburná de Hidalgo Inn, 97203. Mérida, Yucatán, México.

²División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Mérida, Av. Tecnológico Km 4.5 S/N, C.P. 97118. Mérida, Yucatán, México.

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la actividad inhibitoria de crecimiento bacteriano de fracciones peptídicas de la leguminosa *Mucuna pruriens*, obtenidas por hidrólisis enzimática secuencial del concentrado de proteína de sus granos. Se utilizaron granos secos de *Mucuna pruriens* obtenidos en el estado de Yucatán de la cosecha 2015. Para la obtención del concentrado se realizó un fraccionamiento húmedo de los componentes de la harina de los granos y posteriormente se hidrolizaron mediante dos sistemas enzimáticos secuenciales, Alcalase[®]-Flavourzyme[®] y Pepsina-Pancreatina. Para obtener las fracciones peptídicas se efectuó un proceso de ultrafiltración utilizando membranas con diferente corte de peso molecular: 10, 5, 3 y 1 kDa. El grado de hidrólisis fue de 25.34 y 47.28% para los sistemas Alcalase[®]-Flavourzyme[®] y Pepsina-Pancreatina, respectivamente. El contenido de proteína de las fracciones osciló entre 0.114-1.018 mg/mL para Alcalase[®]-Flavourzyme[®] y entre 0.175-1.014 mg/mL para Pepsina-Pancreatina. El peso molecular de las fracciones peptídicas fue verificado mediante electroforesis desnaturizante SDS-PAGE y comparado contra marcadores moleculares comerciales. Las cepas evaluadas fueron *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115. Se efectuaron antibiogramas a cada microorganismo para determinar la sensibilidad a antibióticos conocidos. Las pruebas de difusión en disco fueron negativas para las fracciones peptídicas de ambos sistemas enzimáticos.

Palabras clave

Mucuna pruriens; hidrólisis secuencial; ultrafiltración; fracciones peptídicas; antimicrobianos

Abstract

In the present work, the inhibitory activity of bacterial growth of peptide fractions from the legume *Mucuna pruriens* obtained by sequential enzymatic hydrolysis of the protein concentrate of its grains was evaluated. Dry grains of *Mucuna pruriens* obtained in the Yucatán state from the 2015 crop were used. To obtain the concentrate, a wet fractionation of the components of the grain flour was carried out and subsequently hydrolyzed by two sequential enzymatic systems, Alcalase[®]-Flavourzyme[®] and Pepsin-Pancreatin. To obtain the peptide fractions an ultrafiltration process was performed using membranes with different molecular weight cut: 10, 5, 3 and 1 kDa. The degree of hydrolysis was 25.34 and 47.28%, for Alcalase[®]-Flavourzyme[®] and Pepsin-Pancreatin systems, respectively. The protein content of the peptide fractions ranged from 0.114-1.018 mg/mL for Alcalase[®]-Flavourzyme[®] and from 0.175-1.014 mg/mL for Pepsin-Pancreatin. The molecular weight of the peptide fractions was verified by SDS-PAGE denaturing electrophoresis and compared against commercial molecular markers. The strains evaluated were *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* ATCC 19115. Antibiograms were performed on each microorganism to determine the sensitivity to known antibiotics. Disk diffusion tests were negative for the peptide fractions of both enzyme systems.

KEYWORDS

Mucuna pruriens; sequential hydrolysis; ultrafiltration; peptide fractions; antimicrobials

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: maira.segura@correo.uady.mx (Maira Rubí Segura-Campos).

Recibido el 22 de marzo de 2017; aceptado el 1 de abril de 2017.



Aportación a la literatura científica

Las diversas actividades biológicas que exhiben los péptidos son de gran interés, debido al efecto que han demostrado tener sobre la fisiopatología de enfermedades de tipo crónico degenerativo. Las alternativas para su generación y la búsqueda de fuentes proteicas para obtenerlos, son las estrategias de investigación más abordadas sobre este tema. El presente trabajo plantea como alternativa para la generación de estas moléculas, la hidrólisis enzimática *in vitro*, es decir en condiciones controladas de concentración de sustrato, de enzima, de tiempo de reacción y de temperatura. Como fuente de proteína se sugiere el uso de una leguminosa subutilizada como es el caso de *Mucuna pruriens*. De esta forma se busca generar moléculas bioactivas con potencial aplicación en las industrias alimentaria y farmacéutica, a partir de una fuente de proteína abundante y de bajo costo, revalorizando así el cultivo de *Mucuna pruriens* como alimento y como fuente de ingredientes de tipo nutracéutico.

Los sistemas enzimáticos secuenciales permitieron obtener grados de hidrólisis extensivos, los cuales han demostrado contener péptidos con diversas actividades biológicas. En particular el sistema constituido por enzimas de origen gastrointestinal, generó un mayor grado de hidrólisis. Lo anterior, indica que los péptidos originados por dicho sistema podrían soportar el proceso de digestión después de ser ingeridos, lo cual plantea ventajas de biodisponibilidad. Con la ultrafiltración y la tecnología de membranas, se obtuvieron fracciones peptídicas de peso molecular definido. El uso de fracciones peptídicas para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, plantea una alternativa al uso de antibióticos y a los mecanismos de resistencia que han desarrollado algunos microorganismos. Si bien el ensayo de difusión en disco no reveló actividad antimicrobiana, hay que considerar que diversos péptidos ejercen más de una actividad biológica. Por lo tanto, las fracciones peptídicas aún podrían exhibir otro tipo de actividades, tales como antioxidante, antihipertensiva, antiinflamatoria o hipocolesterolémica. Por lo cual continuar con su estudio resulta promisorio.

Introducción

Hoy en día uno de los grandes retos que enfrenta la industria alimentaria, es proporcionar productos que permanezcan inocuos, desde la salida de la planta de producción, hasta la ingesta por parte del consumidor. Esto se debe principalmente a que muchos de los microorganismos considerados no patógenos por su fácil eliminación o inactivación, han desarrollado resistencia como resultado del uso indiscriminado de antibióticos sintéticos. Por esta razón, es necesario desarrollar antibióticos alternativos, que provean estos nuevos antimicrobianos¹. Los antibióticos de origen vegetal tienen potencial terapéutico, menores efectos adversos asociados al uso de antibióticos sintéticos y, su uso ha demostrado no generar resistencia en los microorganismos².

Listeria monocytogenes y *Escherichia coli* se caracterizan por estar presentes en casi todos los ambientes, y causar enfermedades que pueden ser letales. *L. monocytogenes*, es causante de la listeriosis, padecimiento que tiene una tasa de mortalidad cercana al 20%, siendo los alimentos su principal medio de transmisión. *E. coli* por su parte, que se encuentra comúnmente como comensal en el intestino de los mamíferos, está adquiriendo factores de virulencia de distintas cepas cada vez más agresivas, llegando algunas incluso a desarrollar características combinadas de otras altamente patógenas, provocando cuadros diarreicos que en ciertas condiciones podrían desencadenar la muerte del paciente por deshidratación, sobre todo en menores y personas de la tercera edad³.

Las plantas proveen una rica fuente de metabolitos secundarios, que pueden ser utilizados en el desarrollo y fabricación de fármacos y otros productos bioactivos³. *Mucuna pruriens* es una leguminosa tropical, que posee una alta concentración de proteínas (23%-25%) y tiene potencial como fuente alternativa y económica de estas⁴. Ha sido evaluada la actividad farmacológica de sus extractos como agentes antimicrobianos, anti protozoarios, antiinflamatorios, antidiabéticos, antioxidantes y neuroprotectores⁵. En investigaciones recientes se ha descrito la actividad biológica de fracciones peptídicas de la porción soluble de hidrolizados proteicos de *Mucuna pruriens*, las cuales han presentado en estudios *in vitro* capacidad antioxidante e inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina I (ECA)⁶.

El objetivo del presente proyecto es identificar las fracciones peptídicas de los hidrolizados proteicos de *M. pruriens* con potencial actividad antimicrobiana, en contra de *E. coli* y *L. monocytogenes*, debido al impacto que dichas bacterias tienen en la industria alimentaria y la salud humana.

Métodos

Obtención de harina y concentrado proteico

Los granos de *M. pruriens* se limpiaron manualmente para eliminar las impurezas contenidas, se descascarillaron y se molieron en un molino de discos hasta obtener un tamaño de partícula malla 60. La obtención del concentrado proteico se efectuó por fraccionamiento húmedo de los componentes de la harina⁶. Una suspensión de harina en agua destilada (1:6; p/v) se ajustó a pH 11 con NaOH 0.5 N y se agitó mecánicamente por 1 h a 400 rpm. La suspensión se pasó por un molino de discos y a través de tamices de malla 80 y 100 para separar la fibra de la mezcla de almidón y proteína. El residuo fibroso se lavó cinco veces con agua destilada (200 mL) y el filtrado se juntó con la mezcla de almidón y proteína. Se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante rico en proteína, al cual se le ajustó el pH a 4.5 con HCl 1.0 N y se centrifugó a 1,317 x g por 12 min. El precipitado se secó a -47 °C y 13 x 10⁻³ mbar.

Hidrólisis enzimática y grado de hidrólisis

Se emplearon los sistemas enzimáticos Alcalase®-Flavourzyme® (AF) y Pepsina-Pancreatina (PP) de manera secuencial durante 90 min⁷. Los parámetros del sistema AF fueron: concentración de sustrato 4%, relación enzima/sustrato 0.3 UA/g para Alcalase® y 50 LAPU/g para Flavourzyme®, a pH 8 y 7, respectivamente, y temperatura de 50 °C. Los parámetros del sistema PP fueron: concentración de sustrato 4%, relación enzima sustrato 1/10, temperatura 37 °C, pH 2 para pepsina y pH 7.5 para pancreatina. El tiempo de reacción para ambos sistemas fue 90 min (45 min por enzima). La hidrólisis se inactivó en un baño de agua a 80 °C durante 20 min y finalmente se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min para obtener la porción soluble. El grado de hidrólisis (GH) se determinó empleando la técnica de Ortofenilaldehído (OPA)⁸, la cual está basada en la determinación de grupos aminos libres. Se empleó como estándar una curva de calibración de L-serina (0.2-1.0 μmol/mL). 200 μL de estándar o hidrolizado se mezclaron con 1.5 mL del reactivo OPA, se agitaron en un vortex durante 20 s y la absorbancia se determinó a 340 nm después de 2 min de reacción. El porcentaje de grado de hidrólisis se calculó con la fórmula: %GH = $(h/h_{tot}) \times 100$, donde h es la concentración de grupos aminos libres (meq/g de proteína) y h_{tot} es el número total de enlaces peptídicos presentes en las proteínas de *M. pruriens* que depende de su composición aminoacídica (7.73 mmol/g de proteína).

Obtención de fracciones peptídicas por ultrafiltración

La porción soluble de los hidrolizados se fraccionó utilizando un equipo de ultrafiltración⁹. Se obtuvieron un total de cinco fracciones utilizando cuatro membranas con diferentes cortes de peso molecular: 1, 3, 5 y 10 kDa, iniciando la ultrafiltración con la membrana de 10 kDa, colectando de manera separada el retenido y el permeado. Posteriormente, se continuó con la membrana de 5 kDa y así sucesivamente hasta concluir con la membrana de 1 kDa. Las fracciones se denominaron como: F > 10 kDa, F 5-10 kDa, F 3-5 kDa, F 1-3 kDa y F < 1 kDa. A las porciones solubles de los hidrolizados y a las fracciones obtenidas por ultrafiltración se les determinó el contenido de proteína¹⁰. Se recolectaron los hidrolizados y las fracciones en envases de polietileno estériles y se conservaron en congelación a -18 °C hasta su análisis posterior.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se realizó la electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)¹¹. Se utilizó un volumen de hidrolizado o fracción peptídica que permitió obtener una concentración de proteína de 10 μg/mL en 250 μL de buffer de muestra con β-mercaptoetanol (ME), el cual se compone de trizma base al 0.06% (pH = 6.8), glicerol al 50%, dodecil sulfato de sodio al 10%, y azul de bromofenol al 0.1%. Las muestras se agitaron durante 30 s en vortex, se colocaron durante 2 min en un baño de agua a 100 °C y finalmente se centrifugaron a 1,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Los geles se prepararon al 18% de poliacrilamida. El gel separador se preparó empleando poliacrilamida (acrilamida al 48% y bisacrilamida al 1.5%), regulador de gel a pH 8.5 (trizma base al 36% y SDS al 0.3%), glicerol, agua, persulfato de amonio al 10% y tetrametiletilendiamina (TEMED) para el gel separador. El gel concentrador se preparó con poliacrilamida, regulador de gel (pH = 8.5), agua, persulfato de amonio al 5% y TEMED. Se emplearon dos marcadores de peso molecular. El de alto peso consistió en anhidrasa carbónica bovina (29 kDa), ovoalbúmina 163 (45 kDa), albumina bovina (66 kDa), fosfohidrolasa de conejo (97.4 kDa), β-164 galactosidasa de *E. coli* (166 kDa) y miosina de musculo de conejo (180 kDa). El de bajo peso molecular consistió en mioglobina (16.95 kDa), mioglobina I + II (14.4 kDa), mioglobina I + III (10.6 kDa), mioglobina I (8.1 kDa), mioglobina II (6.2 kDa) y mioglobina III (2.5 kDa). Las condiciones de electroforesis fueron: 110 V y 40 mA por 3 h. Los geles se tiñeron por inmersión en una solución de azul de Coomassie al 0.01% en agua, metanol y ácido acético en una relación 4:1:5 (v/v/v), posteriormente se eliminó el exceso de tinte con una solución preparada con agua destilada, ácido acético y metanol en una relación 5:1:2 (v/v/v).

Cultivo de microorganismos

Se obtuvieron cultivos de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 en caldo Muller-Hinton ajustado con cationes (CMH), los cuales se mantuvieron en refrigeración y se sembraron cada semana para mantener la viabilidad de los microorganismos. Los cultivos de trabajo se obtuvieron inoculando un tubo con 5 mL de CMH con el correspondiente microorganismo, el tubo se incubó por 24 h a 37 °C. Después de la incubación los cultivos se ajustaron a una concentración de 1×10^5 UFC/mL (0.5 McFarland) utilizando CMH.

Prueba de difusión en disco para determinar la actividad antimicrobiana

Se empleó la prueba de susceptibilidad antimicrobiana en disco descrita por el CLSI en las guía M100-S24 para enterobacterias¹¹. Para la prueba en *E. coli* se emplearon cajas de Petri estériles de 150 mm, con agar Muller-Hinton. La superficie del agar fue inoculada empleando un hisopo estéril. Después se colocaron 10 discos de papel filtro estériles de 6 mm de diámetro. Como blanco se utilizó 30 μL de amortiguador de pH Tris-HCl (10 mM, pH 7.4) y en los otros nueve discos se probaron tres concentraciones (0.025, 0.050 y 0.1 mg/mL por triplicado) de porción soluble de hidrolizado o fracción peptídica disuelta en el mismo amortiguador de pH. Se incubó 18 horas a 37 °C en aerobiosis. Los ensayos se efectuaron por triplicado y se reportó el diámetro promedio de la zona de inhibición generada por la porción soluble de hidrolizado o la fracción peptídica. De acuerdo a la guía M100-S24 del CLSI *Listeria monocytogenes* entra en el grupo de bacterias infrecuentes por lo que se utilizó el método de difusión en disco utilizando placas de 100 mm de agar Muller-Hinton suplementado con cationes y 2-5 % de sangre lisada de caballo, recomendado en la guía del CLSI M45-L44 y el EUCAST¹², para la determinación de la sensibilidad de este organismo. Se realizó un antibiograma como prueba de

control de sensibilidad utilizando multidiscos MULTIBAC I.D. para gramnegativos y grampositivos con el fin de obtener los diámetros de inhibición por cada antibiótico que contienen¹².

Resultados

Los grados de hidrólisis obtenidos fueron de 25.34 y 47.28% para los sistemas de Alcalase®-Flavourzyme® y Pepsina-Pancreatina, respectivamente. Las porciones solubles de los hidrolizados extensivos se fraccionaron por ultrafiltración, obteniéndose cinco fracciones peptídicas de diferentes cortes de peso molecular: > 10, 5-10, 3-5, 1-3 y < 1 kDa. Las fracciones peptídicas obtenidas del hidrolizado AF presentaron un contenido proteínico que osciló entre 0.114 y 1.018 mg/mL (Tabla 1) observándose el mayor contenido de proteína en la fracción de 5-10 kDa.

Muestra	Alcalase®-Flavourzyme®	Pepsina-Pancreatina
Hidrolizado	1.018 ± 0.051	1.014 ± 0.050
F > 10 kDa	1.163 ± 0.058	1.569 ± 0.078
F 5-10 kDa	1.253 ± 0.062	1.037 ± 0.052
F 3-5 kDa	0.868 ± 0.043	0.684 ± 0.034
F 1-3 kDa	0.434 ± 0.022	0.551 ± 0.028
F < 1 kDa	0.114 ± 0.006	0.175 ± 0.008

Se presenta la media y la desviación estándar de tres determinaciones.

El contenido de proteína de las fracciones obtenidas del hidrolizado PP osciló entre 0.088 y 1.813 mg/mL. En este sistema el contenido de proteína disminuyó de manera proporcional de acuerdo al peso molecular de las membranas empleadas en la separación de las fracciones de los hidrolizados proteínicos, observándose la mayor cantidad de proteína en la fracción >10 kDa y la menor en la fracción <1 kDa.

Los patrones electroforéticos del concentrado proteínico, los hidrolizados y sus fracciones peptídicas se presentan en la figura 1. En el carril 2 de la figura 1a se observan cinco subunidades polipeptídicas con pesos moleculares de 59, 63, 82, 116 y 200 kDa. Una vez que el concentrado se hidrolizó, las proteínas de alto peso molecular ya no se observan en los patrones electroforéticos (carriles 3 y 4, figura 1a). En cuanto a las fracciones peptídicas del sistema AF, sus patrones electroforéticos revelaron que la intensidad de algunas bandas decrecieron después de la ultrafiltración (Figura 1b).

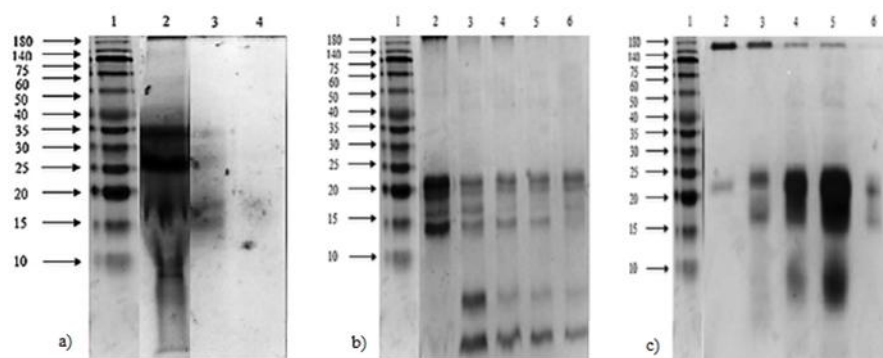


Figura 1. Patrones electroforéticos del concentrado proteínico, las fracciones solubles de los hidrolizados y sus fracciones peptídicas. a) Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: concentrado proteínico, carril 3: hidrolizado AF, carril 4: hidrolizado PP. b) Fracciones peptídicas AF, carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: F > 10 kDa, carril 3: F 5-10 kDa, carril 4: F 3-5 kDa, carril 5: F 1-3 kDa, carril 6: F < 1 kDa. c) Fracciones peptídicas PP, carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: F > 10 kDa, carril 3: F 5-10 kDa, carril 4: F 3-5 kDa, carril 5: F 1-3 kDa, carril 6: F < 1 kDa.

El mismo patrón se observó con las fracciones peptídicas del sistema PP (Figura 1c). Dada la relación inversamente proporcional distancia/peso molecular, las fracciones de menos de 1 kDa, migraron una mayor distancia quedando en la porción inferior del gel en contraste con las mayores de 10 kDa. Estas concordaron con la distancia de las bandas de los marcadores moleculares utilizados y los pesos moleculares que se esperaban tener en al finalizar el proceso de ultra filtrado.

Las pruebas de ultrafiltrado en disco utilizadas para evaluar la susceptibilidad bacteriana a las fracciones peptídicas, indicaron que el crecimiento bacteriano no fue afectado por las fracciones peptídicas a ninguna de las concentraciones evaluadas (0.025, 0.050 y 0.1 mg/mL). Para evidenciar la sensibilidad de los organismos utilizados se realizaron antibiogramas con antibióticos conocidos (Tabla 2).

Tabla 2. Antibiogramas de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*.

Antibiótico	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Antibiótico	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115
Nitrofurantoína	S	Eritromicina	S
Cloranfenicol	S	Vancomicina	S
Ciprofloxacina	S	Tetraciclina	S
Cefatoxima	S	Sulfametoxazol	S
Cefalotina	S	Clindamicina	R
Carbenicilina	R	Dicloxacilina	R
Ampicilina	R	Gentamicina	S
Sulfametoxazol	S	Penicilina	R
Norfloxacino	S	Cefalotina	R
Netilmicina	I	Ampicilina	R
Gentamicina	I	Ciprofloxacina	R
Amikacina	S	Cefatoxima	R

Resistente (R), intermedio (I), o sensible (S).

En el caso de *E. coli*, esta bacteria fue sensible a ocho antibióticos y resistente a dos (Carbenicilina y Ampicilina). *L. monocytogenes* por su parte, fue sensible a cinco antibióticos y resistente a siete (Clindamicina, Dicloxacilina, Penicilina, Cefalotina, Ampicilina, Ciprofloxacina y Nitrofurantoína). Comparativamente, de esta forma *L. monocytogenes* presentó un mayor espectro de resistencia.

Discusion

El grado de hidrólisis determinado por el método de OPA, indicó que el sistema conformado por las enzimas gastrointestinales Pepsina y Pancreatina fue 1.9 veces mayor que el sistema conformado por las enzimas comerciales Alcalase® y Flavourzyme®. Por lo tanto, el sistema PP hidrolizó una mayor cantidad de concentrado proteínico, pudiendo de esta forma generar mas péptidos. La cantidad de péptidos generados durante la hidrólisis es un factor determinante para la actividad biológica que pueda exhibir un hidrolizado¹³.

Una forma de separar y concentrar dichos péptidos en base a su peso molecular, es la ultrafiltración junto con la tecnología de membranas. En este sentido, por la distribución de la concentración de proteína en las diferentes fracciones, el sistema AF generó principalmente péptidos con pesos de 5 a 10 kDa y de 3 a 5 kDa (Tabla 1). Esto pudo deberse a que las enzimas comerciales Alcalase® y Flavourzyme® presentan actividades de endo y exopeptidasas, lo cual genera la presencia de péptidos de mediano peso molecular. Para el caso del sistema PP, éste generó principalmente péptidos con pesos de > 10 kDa y de 5 a 10 kDa. Esto pudo deberse a que las enzimas comerciales gastrointestinales presentan solo actividad de endopeptidasas, lo cual genera la presencia de péptidos de mayor peso molecular y menor cantidad de péptidos de bajo peso (Tabla 1).

El patrón electroforético que presentó el concentrado proteínico (Carril 1. Figura 1a), es similar al reportado por otros autores^{14, 15}. Para el caso de los hidrolizados obtenidos con los sistemas secuenciales, el patrón electroforético del hidrolizado PP (Carril 4, figura 1a) mostró un mayor grado de hidrólisis. Lo anterior, coincide con los porcentajes de hidrólisis calculados químicamente y con la distribución del contenido de proteína en las fracciones peptídicas.

En las pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano, ninguna fracción presentó resultados positivos. La actividad antimicrobiana de los péptidos, se asocia a las interacciones que éstos puedan tener con la membrana de los microorganismos y la ruptura de la misma¹⁶, a la formación de poros¹⁷, y a la alteración de mecanismos intracelulares principalmente en la inhibición de la síntesis de ADN y su consecuente biosíntesis de proteínas¹⁸, esta capacidad de interacción es debida en gran medida por la estructura proteica y/o la secuencia específica de aminoácidos del péptido. Así mismo, los antibiogramas demostraron la resistencia que presentaron ambas cepas a antibióticos comerciales puros. Por lo tanto, la falta de actividad de las fracciones, puede atribuirse a que se trata de conjuntos de péptidos y no de péptidos puros o sintetizados. Lo anterior, sugiere fenómenos de antagonismo o de falta de concentración mínima para ejercer el efecto antimicrobiano siendo así necesario secuenciar los péptidos para poder sintetizarlos y probarlos de manera más efectiva en los ensayos.

Conclusiones

Los sistemas enzimáticos secuenciales permitieron obtener grados de hidrólisis extensivos, obteniéndose el mayor grado de hidrólisis con las enzimas gastrointestinales Pepsina y Pancreatina. Los patrones electroforéticos de peso molecular y la distribución de la concentración de proteína en las fracciones peptídicas indicó que la ultrafiltración y la tecnología de membranas permitieron obtener conjuntos de péptidos con pesos moleculares en intervalos definidos. Los ensayos de inhibición de crecimiento bacteriano con las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, indicaron que ninguna de las fracciones peptídicas fue efectiva. Los resultados indican que es necesario emplear otra estrategia de purificación que permita secuenciar los péptidos y sintetizarlos, de manera

que puedan ser utilizados puros y en mayor contracción en los ensayos antimicrobianos. De esta forma podrán evitarse los fenómenos de antagonismo y de falta de concentración mínima para ejercer el efecto.

Financiación

Sin financiación.

Agradecimientos

A la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán y a la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Mérida.

Conflicto de interés

Sin conflicto de interés.

Referencias

1. Garba S, Salihu L, Ahmed MU. Antioxidant and antimicrobial activities of *Waltheria indica* and *Mucuna pruriens*. J Pharm Sci Innovation. 2012; 1(5):5-8.
2. Yerra R, Gupta M, Mazumder UK. *In vitro* lipid peroxidation and antimicrobial activity of *Mucuna pruriens* seeds. Iran J Pharmacol Ther. 2005; 4:32-35.
3. Vikran PN, Roopchandani K, Gupta A, Kshitij A, Choudhary R. *In vitro* antimicrobial activity of benzene and chloroform extract of *Mucuna pruriens*. J Pharmacogn Phytochem. 2013; 5:19-23.
4. Segura MR, Espadas CP, Chel L, Betancur D. ACE-I inhibitory peptide fractions from enzymatic hydrolysates of velvet bean (*Mucuna pruriens*). Agric Sci. 2013; 4(12):767-773.
5. Shree MS, Kumar BS. Antifungal and anthelmintic activity of extracts of *Mucuna pruriens* seeds. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol. 2011; 1:4.
6. Herrera FG, Ruiz JC, Acevedo JJ, Betancur D, Segura MR. ACE inhibitory, hypotensive and antioxidant peptide fractions from *Mucuna pruriens* proteins. Process Biochem. 2014; 49(10):1691-1698.
7. Pedroche J, Yust M, Girón N, 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.
8. Nielsen P, Petersen D, Dammann C. Improved method for determine food protein degree of hydrolysis. J Food Sci. 2001; 66:642-648.
9. Cho MJ, Unklesbay N, Hsieh F, Clarke AD. Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. J Agric Food Chem. 2004; 52:5895-5901.
10. Lowry O, Rosebrough NJ, Farr L, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol Chem. 1951; 193:267-275.
11. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: CLSI. 2014; 50-52.
12. Method for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Proposed Guideline. M45-P CLSI. 2005; 25-27.
13. Park P, Jung W, Nam K, Shahidi F, Kim S. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. J Amer Oil Chem Soc. 2001; 78(6):651-656.
14. Adebowalea KO, Lawal OS. Foaming, gelation and electrophoretic characteristics of *Mucuna* bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrates. Food Chem. 2003; 83:237-246.
15. Machuka J. Characterisation of the seed proteins of velvet bean (*Mucuna pruriens*) from Nigeria. Food Chem, 2000; 68:421-427.
16. Nicolas, P. Multifunctional hosto defense peptides: Intracellular-targeting antimicrobial peptides. FEBS J. 2009; 275:6483-6496.
17. Zeitler B, Herrera-Diaz A, Dangel A, Thellmann M, Meyer H, Sattler M, Lindermayr C. De-Novo design of antimicrobial peptides for plant protection. PloS One. 2013; 8:71-87.
18. Chadha, P, Das HA. Pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: An insight of its mode of antifungal activity. Planta. 2006; 225:213-222.