

Extracción y Caracterización de Péptidos Bioactivos a partir de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en su Variedad Pinto Saltillo

E. Landeros-Soriano¹, M.N. Regalado-Pérez^{1,2}, J. Aguayo Rojas¹, L. Delgadillo-Ruiz³

1 División de Ingeniería en Industrias Alimentarias, Instituto Tecnológico Superior de Jerez.

2 Universidad Autónoma de Durango, Campus Zacatecas.

3 Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas.

mayra.rp@hotmail.com

RESUMEN:

El presente proyecto de investigación se desarrolla con la finalidad de dar aportes que mejoren la calidad de los insumos agroalimentarios y potencializar la obtención de subproductos para la industria alimentaria, dando la oportunidad al desarrollo de nuevos productos. Se propone un plan experimental que permite realizar la extracción y caracterización de los péptidos liberados de las proteínas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Pinto Saltillo a través de un método de hidrólisis enzimática haciendo el uso comparativo de tres enzimas proteolíticas de grado comercial: bromelina, papaína y una proteasa neutra bacteriana en tres proporciones enzima/sustrato; además de conocer y aproximar la naturaleza de estos compuestos por la presencia de determinados aminoácidos utilizando espectroscopia UV-Vis. A partir de los resultados obtenidos se encuentra que el utilizar papaína al 7.130% es posible obtener hasta un 95.5% en rendimiento respecto al volumen inicial de materia hidrolizada. En la caracterización de los péptidos se tiene que en la papaína al 7.130%, los espectros de absorción muestran un aproximado en la presencia de enlaces peptídicos con cadenas de fenilalanina, tirosina y triptófano con absorbancia entre 240-300nm, lo cual se relaciona con el sitio catalítico de la enzima sobre estos aminoácidos.

Palabras clave: hidrólisis, frijol, péptidos.

ABSTRACT:

The present research Project is developed with the finality of contributions that improve the quality of the agro-alimentary inputs and potentiate the obtaining of by-products for the food industry, giving the opportunity to the development of new products. It is proposed an experimental plan that allows the extraction and characterization of the peptides released from bean proteins (*Phaseolus vulgaris* L.) Pinto Saltillo variety through a method of enzymatic hydrolysis making the comparative use of three commercial grade proteolytic enzymes: bromelain, papain and a bacterial protease subtilisin in three enzyme/substrate proportions; besides knowing and approach the nature of these compounds and the presence of certain amino acids using UV-Vis spectroscopy. From the obtained results are found that using papain at 7.130% it is possible to obtain up to 95.5% in yield with respect to the initial volume of hydrolyzed matter. In the characterization of the peptides it has in papain at 7.130%, the absorption spectra show an approximate in the presence of peptide bonds with chains of phenylalanine, tyrosine and tryptophan with absorbance between 240-300nm, which is related with the catalytic site of the enzyme on these amino acids.

Keywords: hydrolysis, bean, peptides.

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas (familia *Leguminosae*) son un grupo de plantas dicotiledóneas que se caracterizan por crecer en forma de vaina, donde están contenidos granos o semillas secas. El frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) es miembro de esta familia y sus variedades, del cual pueden cultivarse aproximadamente 500 y estas se clasifican de acuerdo a su consumo como grano seco y por sus características en cuanto a tamaño y color.

El estado de Zacatecas contribuye con el 28.2% de la producción nacional de frijol común (*P. vulgaris L.*), formando parte de los seis estados donde se obtiene más del 71.4% de esta leguminosa en México, en conjunto con Sinaloa, Durango, Chihuahua, Nayarit y Chiapas (Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario Rural, Forestal y Pesquero, 2014).

La semilla de la variedad Pinto Saltillo fue liberada en 2001 bajo el número de registro 1424-FRI-026-120901/C del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (Ramírez, *et al.*, 2011). Esta oportunidad se da gracias a las condiciones hidrológicas y edáficas que permiten un cultivo óptimo para el frijol. Esta variedad presenta algunas ventajas como resistencia a sequías, aumento en el rendimiento por hectárea y mayor vida de anaquel.

En el país, la industrialización del frijol se presenta en dos modalidades: industria beneficiadora/encostaladora, que tiene por objetivo otorgar buena presentación en el producto a granel aplicando técnicas de selección, higiene y sanidad; e industria de la transformación, donde se obtiene frijol deshidratado y enlatado (Figueroa González, *et al.*, 2011).

Los péptidos bioactivos son los fragmentos resultantes de un tratamiento bioquímico en las proteínas intactas, estando inactivas dentro de ellas y que al liberarse se activan para actuar en beneficio de la salud del organismo y presentando algunas propiedades relacionadas en el control de los sistemas nervioso y circulatorio, principalmente (Campos, *et al.*, 2013).

En las etapas para la extracción de péptidos, es importante realizar previamente una evaluación bioquímica de muestras de harina de frijol para determinar experimentalmente el rendimiento y caracterización de los extractos.

De ello, deriva la oportunidad de que al obtener estos extractos se puedan utilizar posteriormente en la formulación de concentrados, hidrolizados o aislados, de acuerdo al tipo de proceso de extracción y del grado de pureza del producto.

En el desarrollo del presente proyecto de investigación se tiene como Objetivo General:

- Extraer y caracterizar péptidos con propiedades bioactivas a partir del frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) en su variedad Pinto Saltillo mediante la aplicación de hidrólisis enzimática y espectroscopia UV-Vis.

Se destaca la importancia de aplicar un desarrollo experimental con el objetivo de evaluar la viabilidad y optimización de un proceso agroalimentario. En el caso particular se determina que, a través de un proceso de hidrólisis enzimática es posible obtener precipitados que contengan péptidos de bajo peso molecular con propiedades biológicamente activas, lo que indica que luego del tratamiento se logra estimular la funcionalidad de estos compuestos que inicialmente se encuentran inertes dentro de las proteínas. Con los presentes avances de la investigación, se menciona que el utilizar papaína en una proporción del 7% es posible obtener hasta un 95.5% en rendimiento respecto al volumen inicial de materia hidrolizada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el desarrollo experimental, se realiza la extracción mediante hidrólisis enzimática y la caracterización de péptidos por espectroscopia UV-Vis, a partir de la harina de frijol Pinto Saltillo. Se considera un diseño factorial con el objetivo de estudiar el efecto individual y la interacción de varios factores sobre una variable de respuesta: rendimiento obtenido de la hidrólisis enzimática.

Los factores son de tipo cualitativo (tipo de enzima proteolítica) y de tipo cuantitativo (proporción enzima/sustrato). Por tanto, para determinar el grado de interacción entre ellos, se eligen tres niveles de prueba para el tipo de enzima y tres niveles para la proporción enzima/sustrato.

La construcción resultante del diseño factorial es 3 X 3 con $k = 2$ factores y se decide realizar una matriz de diseño donde se identifican estos tratamientos considerando las combinaciones posibles de los niveles de los factores, lo cual se resumen en la Tabla I. Las enzimas proteolíticas que se utilizan son de grado comercial y fueron solicitadas a PIQ (Proveedor Internacional de Químicos); por lo que se siguen las recomendaciones descritas por el proveedor para sus condiciones óptimas.

		Tabla I. Matriz de diseño		B: Proporción enzima/sustrato		
		Designación nominal	Nombre de la enzima	1%	5%	7%
A: Tipo de enzima proteolítica	1		Papaína (Papain Powder NFCC 6000 PU/mg)	Y_{ij}	Y_{ij}	Y_{ij}
	2		Bromelina (Bromelain 1:10 – 80 GDU)	Y_{ij}	Y_{ij}	Y_{ij}
	3		Proteasa neutra bacteriana (HT PROTEOLITIC® 200)	0.01%	0.05%	0.07%

El método que se considera para llevar a cabo la hidrólisis enzimática tiene como base los fundamentos propuestos por Beuchat (1977) con algunas modificaciones experimentales. Se realiza la molienda para obtener la harina de frijol, se suspende en agua desionizada y se realiza el ajuste de pH de la suspensión de acuerdo a las condiciones óptimas.

Para la aplicación de la enzima se someten al tratamiento hidrolítico cuatro muestras: tres correspondientes a cada enzima según como se indica en el diseño y se decide realizar una repetición de cualquier proporción enzima/sustrato que, por finalidades comparativas, se agrega una sustancia amortiguadora de pH (*buffer* de fosfatos). Al adicionar la enzima en su proporción enzima/sustrato se procede a una agitación constante para iniciar el proceso de hidrólisis. Al concluir la agitación, se inactiva la enzima por un aumento de temperatura.

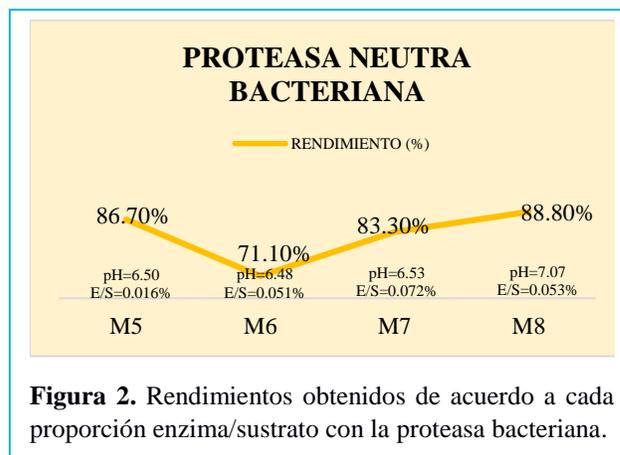
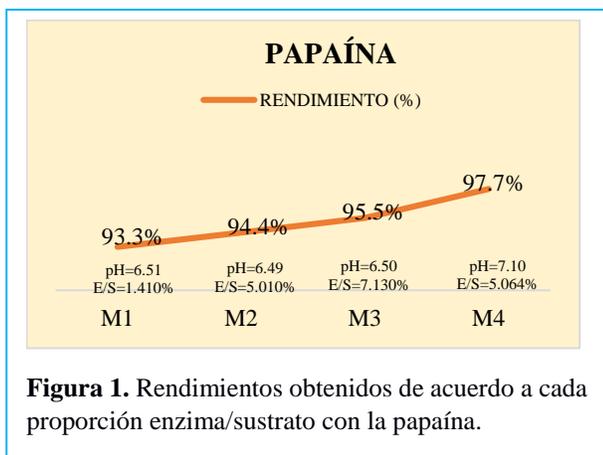
Para someter a centrifugación se preparan tres submuestras, para las que posteriormente se mide la presencia del residuo insoluble y el sobrenadante con el fin de evaluar el rendimiento de acuerdo al tipo de enzima y proporción enzima/sustrato.

En la caracterización se procede a realizar diferentes diluciones de las muestras además de una muestra concentrada (muestra blanco) obtenidas luego de la centrifugación. Se preparan iniciando con un volumen inicial de la muestra blanco, y de esta se toma una alícuota para la primera submuestra diluida en agua destilada.

De cada submuestra se prepara 1ml en una cubeta del espectrofotómetro. Se coloca la cubeta donde se insertan las muestras y se realiza el procesamiento de la información del instrumento de absorción molecular en conexión con un ordenador para guardar los datos correspondientes a cada lectura. Los archivos con los datos correspondientes a cada muestra contienen los valores de la longitud de onda en nanómetros (x) y el valor de la absorbancia de las especies orgánicas (y).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A través de las siguientes gráficas se muestra el rendimiento porcentual obtenido luego de la hidrólisis enzimática. En la Figura 1, se observa que el utilizar papaína en una proporción del 7.130% es posible obtener hasta un 95.5% en rendimiento respecto al volumen inicial de materia hidrolizada. Este valor se compara con el rendimiento el 97.7% con la proporción del 5% que, a diferencia de la anterior, en este se agrega una solución amortiguadora de pH (buffer de fosfatos).

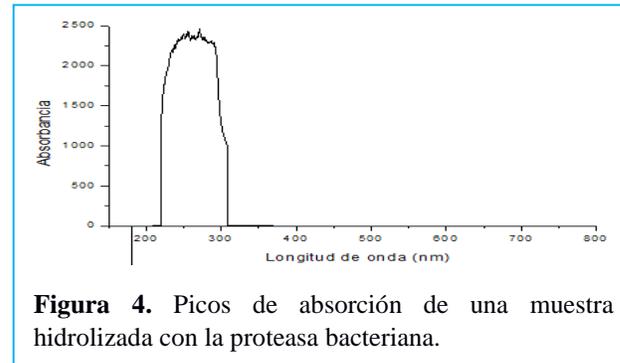
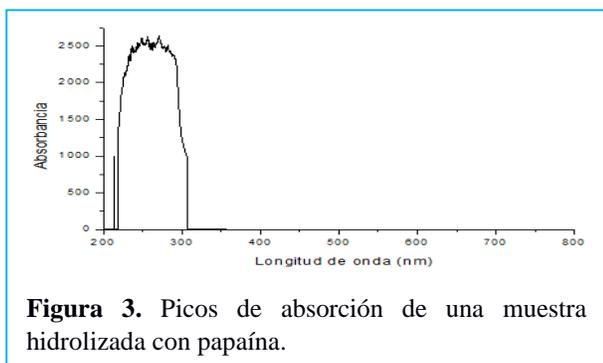


Como lo muestra la Figura 2, el utilizar la proteasa neutra bacteriana entre las proporciones 0.016-0.053% es posible obtener rendimientos entre 70 a <90%, los cuales son valores que se consideran aceptables para su aplicación.

En la aplicación de la bromelina, el efecto obtenido (valor del rendimiento) presenta un valor del 66.7% en cada proporción enzima/sustrato. Alguna de las causas asociadas a este resultado es debido a la naturaleza de interacción de la enzima.

Luego de realizar la caracterización por espectroscopia UV-Vis, se obtienen las gráficas con el software OriginPro 8®. Con la papaína (E/S al 7.130%), se muestra un espectro que expone picos de absorción en la región aproximada de 250nm a 350n, como se muestra en la Figura 3. Con la aplicación de hidrólisis enzimática, el peso molecular de las especies resultantes es menor respecto a la molécula antes del tratamiento, ya que ocurre el fraccionamiento de las proteínas a péptidos, en lo que ocurre la exposición de grupos de aminoácidos no polares y presencia de cadenas laterales de aminoácidos.

En el espectro se muestra que a 280nm ocurren los mayores picos de absorción, describe la presencia de péptidos con cadenas laterales aromáticas por la presencia de fenilalanina, tirosina y triptófano, que muestran sus valores de absorbancia entre 240-300nm.



La bromelina tiene su sitio catalítico sobre aminoácidos como glicina, fenilalanina, metionina y cisteína. En la Figura 4, se observa que a partir de 210nm comienza el grado de absorción con máximos a 260 a 280nm por la presencia de puentes disulfuro S-S producidos entre dos residuos de cisteína.

Con la realización del presente proyecto se destaca la potencialidad que otorga las materias primas presentes en la región, dando un valor agregado a los productos que se elaboran a partir de éstas y sobre todo el aplicar un desarrollo experimental con el objetivo de mejorar y evaluar la viabilidad y optimización de un proceso agroalimentario.

Para evaluar el proceso de hidrólisis enzimática a gran escala, se recomienda el uso de enzimas que estén certificadas para su aplicación en la industria alimentaria. Así también, se debe considerar una posterior etapa de liofilización para lograr la eliminación de materia líquida en la materia hidrolizada, y así garantizar la obtención de un sólido.

Es importante el controlar los parámetros fisicoquímicos como pH y temperatura, con el fin de otorgar calidad en los atributos del producto y su inocuidad.

En la actualidad, para la formulación de alimentos funcionales, se pretende potencializar el uso de hidrolizados y concentrados proteicos que presenten estas propiedades con el fin de dar valor agregado a la materia prima, así como otorgar mejoras a la salud.

BIBLIOGRAFÍA

- Espinoza Arellano, J.d, González Ramírez, H., Rosales Serna, R., Pajarito Ravelero, A., Zandate Hernández, R., Ávila Marioni, M.R. 2011. "Caracterización de los productores, adopción e impacto económico del uso de la variedad de frijol "Pinto Saltillo" en el norte centro de México", *Revista Mexicana de Agronegocios* [en línea], Vol. XV, No. 29, Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14119052007>> ISSN 1405-9282
- Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario Rural, Forestal y Pesquero. 2014. "Panorama del frijol". *Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica, Análisis Sectorial y Tecnologías de la Información*. Secretaría de Hacienda y Crédito Público. Disponible en: <http://www.financiararural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Ficha%20Frijol.pdf>
- Benitez, R., Ibarz, A. y Pagan, J. 2008. "Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones". *Acta bioquím. clín. latinoam.* [en línea], Vol. 42, No. 2. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572008000200008&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1851-6114.
- Segura Campos, M., Betancourt Ancona, D., y Chel Guerrero, L. 2013 "Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias." *Facultad de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán*, 111-139.
- Figueroa González, J.J., Juárez Ibarra, C.A., Herrera Hernández, M.G., Guzmán Maldonado, S.H. y Sánchez Toledo, B.I. 2011. "Manual. Elaboración de productos agroindustriales de frijol", *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias – Campo Experimental Zacatecas*, Publicación especial No. 21.
- Skoog, D.A., Holler F.J. y Crouch S.R. 2008. "Principios de análisis instrumental", *Cengage Learning*, 336-367.
- Ramírez, H. G., Ravelero, A. P., Arellano, J. d., Marioni, M. R., Serna, R. R., & Hernández, R. Z. 2011. Caracterización de los productores, adopción e impacto económico del uso de la variedad de frijol "Pinto Saltillo" en el norte centro de México. *Revista mexicana de Agronegocios*, 682-692.