

Efecto diferencial del suministro de agua de riego en frijol sobre la capacidad de inhibición de enzimas digestivas

Herrera M.D.^{a*}, Lozada-Carlos M.M.^a, Servín-Palestina M.^a

^a INIFAP Campo Experimental Zacatecas. Carretera Zacatecas-Fresnillo Km 24.5, Calera de Víctor Rosales, Zacatecas. C.P. 98500.

*herrera.mayra@inifap.gob.mx

RESUMEN:

Los rendimientos del frijol común disminuyen debido a un suministro de agua inadecuado durante la temporada de cultivo, lo que lleva a una condición de estrés hídrico. Sin embargo, esta condición aumenta la síntesis de compuestos bioactivos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes regímenes de riego sobre la capacidad de las semillas de frijol común para inhibir las enzimas digestivas. En el campo, los tratamientos de riego fueron: 50/50, 50/100, 100/50 y 100/100 de suministro de agua durante la etapa vegetativa/reproductiva. En el laboratorio, las semillas de frijol común se cocieron y liofilizaron para evaluar la inhibición de α -amilasa, α -glucosidasa y lipasa pancreática. Los resultados mostraron que, en general, los tratamientos 50/50 y 50/100 fueron sobresalientes en la inhibición de las dos primeras enzimas, mientras que el tratamiento 50/50 tuvo la mayor capacidad para inhibir la lipasa pancreática. En conclusión, el suministro de agua durante el crecimiento de la planta de frijol común tiene una estrecha relación con la síntesis fitoquímicos con capacidad para inhibir las enzimas digestivas..

Palabras clave:

Frijol, suministro de agua, inhibición de enzimas, déficit hídrico

ABSTRACT:

Common bean yields are decreased due to an inadequate water supply during the cropping season, leading to a water-stress condition. Nevertheless, this condition increases the synthesis of bioactive compounds. The aim of this study was to evaluate the effect of different irrigation regimes on the capacity of common bean seed to inhibit digestive enzymes. In the field, irrigation treatments were: 50/50, 50/100, 100/50 and 100/100 of water supply during the vegetative/reproductive stage. In the laboratory common bean seeds were cooked and freeze dry to evaluate inhibition of α -amylase, α -glucosidase and pancreatic lipase. Results showed that, overall the 50/50 and 50/100 treatments were outstanding in the inhibition of the first two enzymes, while treatment 50/50 had the greater capacity to inhibit the pancreatic lipase. In conclusion, the water supply during the common bean plant growth has a close relationship with phytochemical synthesis with capacity to inhibit digestive enzymes..

Key words:

Bean, water supply, enzyme inhibition, deficit irrigation

Área: Cereales, leguminosas y oleaginosas

INTRODUCCIÓN

El frijol común es la leguminosa de grano más importante para el consumo humano directo. Se considera una fuente importante de minerales, especialmente hierro y zinc, proteínas y carbohidratos, principalmente fibra dietaria y oligosacáridos, así como compuesto bioactivos como los polifenoles, fitoesteroles y saponinas (Beebe et al., 2013; Xu et al., 2007). Sin embargo, además de su importancia nutrimental, los fitoquímicos juegan un papel importante en el mecanismo de defensa contra diferentes factores bióticos y abióticos como los plagas y patógenos, altas y bajas temperaturas y sequía, entre otros (Jansen et al., 2009; Kigel, 1999).

Bajo el contexto anterior, la sequía está relacionada con una distribución desfavorable de lluvia durante el periodo de crecimiento de la planta y las fluctuaciones en la precipitación que se presentan año con año, lo que constituye un obstáculo importante para la producción, crecimiento y rendimiento del cultivo del frijol. Los bajos rendimientos

están ampliamente relacionados con la sequía que pudiera existir durante el crecimiento de la planta ya que, ante este fenómeno, la humedad del suelo en la zona radicular no satisface los requerimientos hídricos (Karam et al., 2009). No obstante, se ha reportado que la sequía estimula la expresión de genes relacionados con la activación de mecanismos de defensa, lo que permite un incremento en la síntesis de fitoquímicos con propiedades funcionales (Jiang et al., 2007). Debido a lo anterior, resulta necesario optimizar el proceso de irrigación en la producción del cultivo del frijol común con el propósito de incrementar su contenido de fitoquímicos sin comprometer los rendimientos finales del grano.

Se ha reportado diferentes resultados experimentales relacionados con la utilización de estrategias de déficit hídrico, durante etapas fenológicas específicas de diferentes cultivos, entre los que se puede mencionar avena (Ali et al., 2007), maíz (Cakir, 2004), papa (Fabeiro et al., 2001) y frijol (Webber et al., 2006); sin embargo, las variables respuesta analizadas se limitan a componentes agronómicos de las plantas, como el rendimiento del grano o fruto, es decir, existe una falta de información en relación a la utilización de esta estrategia de producción y la síntesis de fitoquímicos que denoten los cambios metabólicos y bioquímicos presentes en plantas de interés agrícola sujetas al déficit. Por otro lado, diferentes autores han evaluado el efecto de un estrés hídrico sobre la concentración de algunos fitoquímicos en la semilla de frijol, como aminoácidos, proteínas, oligosacáridos y polifenoles, no obstante, la suspensión del suministro del agua se realizó en la etapa reproductiva, sin intención de llevar a cabo alguna estrategia de producción (G. de Mejía et al., 2003; Herrera et al., 2014).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue realizar la producción de frijol bajo diferentes niveles de humedad (incluyendo déficit hídrico) durante las dos fases de desarrollo de la planta del frijol, con el fin de identificar cambios en la capacidad del frijol común para inhibir enzimas digestivas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de las parcelas experimentales. La siembra de frijol se realizó en el ciclo P-V del 2016, utilizando la variedad de frijol Flor de Junio Dalia con una densidad de siembra de 40 kg ha⁻¹ en surco sencillo de 76 cm de ancho. La separación entre plantas fue de aproximadamente 10 cm para una población de 131 mil plantas por ha. Se fertilizó con base al muestreo inicial de suelos, con la fórmula 50 – 60 – 30, aplicando la mitad del fertilizante al momento de la siembra y el resto en el primer riego de auxilio.

Para regar el área experimental se instaló tubería presurizada para conducir el agua desde la fuente de abastecimiento. También se instaló hidrantes cada 36 m a lo largo de la tubería de conducción para conectar tubería de compuertas con que se regó el área adyacente al experimento. Para el riego de las parcelas experimentales se utilizó tubería de 38.1 mm de diámetro, con conexiones para la unión de una manguera y un medidor volumétrico calibrado con el cual se aplicó de manera precisa el volumen de agua requerido.

Los niveles de humedad que se manejaron durante el experimento fueron: 50/50 por ciento de humedad aparente (% HA) del suelo durante la etapa vegetativa/reproductiva, 50/100, 100/50 y 100/100. Y se siguió un diseño experimental en bloques al azar con tres repeticiones.

Preparación de las muestras de frijol. Después de que las plantas de frijol alcanzaron la madurez fisiológica, se cosechó y trilló cada muestra por separado. En laboratorio, se coció la semilla de frijol y se liofilizó con agua de cocción a 90 °C, posteriormente se liofilizó las muestras y se molieron con ayuda de un molino doméstico (KRUPS) para almacenar a 4 °C hasta su análisis.

Se obtuvo un extracto de las muestras de frijol cocido liofilizado mezclando 1 g de harina de frijol con 10 mL de solución de extracción que contenida acetona:agua:ácido acético 69.5:0.5:30 v/v/v y se dejó en agitación a 60 RPM durante 24 h protegiendo de la luz.

Inhibición de la α -amilasa.

La actividad de α -amilasa se determinó de acuerdo con la metodología propuesta por Kandra et al (2005). Por lo tanto, 50 μ L del extracto acetónico de las muestras de frijol y 50 μ L de α -amilasa de *Bacillus subtilis* (50 U/mg) se preincubaron durante 20 minutos en un baño de agua a 37 °C. El sustrato fue almidón (1%) preparado en tampón de fosfato a pH 7,0 con 38 mmol/l de NaCl. Después de la adición de 100 μ L del sustrato, la mezcla se incubó

durante 2 h. El producto (glucosa) se cuantificó mediante el método de glucosa oxidasa-peroxidasa con un kit comercial (RANDOX) y se midió a 500 nm.

Inhibición de la α -glucosidasa. La inhibición de la α -glucosidasa se analizó utilizando 50 μ l de solución de extracto de frijol y 100 μ l de tampón de fosfato 0.1 M (pH 6,9) que contenía una solución de α -glucosidasa (1.0 U/ml) y se incubó en placas de 96 pocillos a 25 ° C durante 10 min. Después de la preincubación, se añadieron 50 μ l de solución de p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido 5 mM en tampón de fosfato 0.1 M (pH 6,9). Las mezclas de reacción se incubaron a 25 ° C durante 5 min. Antes y después de la incubación, las lecturas de absorbancia se registraron a 405 nm mediante un lector de microplacas (MultiScan Go, Thermo Scientific) y se compararon con un control que tenía 50 μ l de solución tampón en lugar del extracto (Apostolidis *et al.*, 2007).

Inhibición de la lipasa pancreática. La lipasa pancreática de porcino tipo II se disolvió en agua ultrapura a 10 mg/ml; posteriormente se usó el sobrenadante después de centrifugar la solución a 16,000 rpm durante 5 min. El tampón para el ensayo fue buffer Tris 100 mM (pH 8,2) y se utilizó laurato de p-nitrofenilo (PNP) como sustrato a concentración de 0,08% p/v de laurato de PNP disuelto en acetato sódico 5 mM (pH 5,0) que contenía Triton X-100 al 1%. Esta solución se calentó en agua hirviendo durante 1 minuto para ayudar a la disolución, se mezcló bien y luego se enfrió a temperatura ambiente.

En el ensayo cada tubo contenía 400 μ L de tampón de ensayo, 450 μ L de solución de sustrato y 150 μ L de lipasa. Para el caso de los extractos de frijol, se agregaron 450 μ L y se incluyó un control que contenía el mismo volumen en buffer de Tris 100 mM. Las muestras se incubaron a 37 ° C durante 2 h. Luego las muestras se centrifugaron a 16,000 rpm durante 2,5 minutos y se leyeron a 400 nm en un lector de microplacas (MultiScan Go, Thermo Scientific) (McDougall *et al.*, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la inhibición de enzimas digestivas son una variable importante en el potencial nutracéutica de un alimento (McDougall *et al.*, 2009), en el caso del frijol, se ha demostrado que reduce la concentración de glucosa en sangre y triglicéridos (McCarty *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2013); por lo tanto, la evaluación de la inhibición de las enzimas digestivas in vitro representa un enfoque preliminar del potencial biológico del frijol sometido a los diferentes niveles de humedad según su etapa de desarrollo. La α -amilasa pancreática hidroliza el almidón a oligosacáridos, que luego son hidrolizados a glucosa por α -glucosidasa intestinal. La lipasa pancreática hidroliza los triglicéridos a los ácidos grasos libres y es responsable de la hidrólisis del 50-70% de las grasas totales de la dieta (Figueroa-Pérez *et al.*, 2014).

En la Tabla 1 se observa que existe una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre la capacidad que tiene el grano de frijol obtenido de las plantas cultivadas bajo el tratamiento 50/50 y 100/50; de manera interesante, el resto de los tratamientos no tuvieron la capacidad de inhibir la enzima. Esto pudiera estar relacionado con el hecho de que los tratamientos 50/50 y 100/50 activaron la síntesis de fitoquímicos capaces de inhibir esta enzima en particular, ya sea por el déficit hídrico presente durante todo el ciclo de crecimiento de la planta o solamente durante la etapa reproductiva, respectivamente.

Tabla 1. Capacidad de frijol sometido a diferentes niveles de humedad para inhibir la α -amilasa.

HA % etapa vegetativa/reproductiva	% de inhibición
50/50	1.77 \pm 0.01 b
50/100	NI
100/50	14.16 \pm 2.50 a
100/100	NI

Los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar, letras diferentes entre barras indican diferencia significativa ($P < 0.05$) con la prueba de t de Student. HA, humedad aparente.

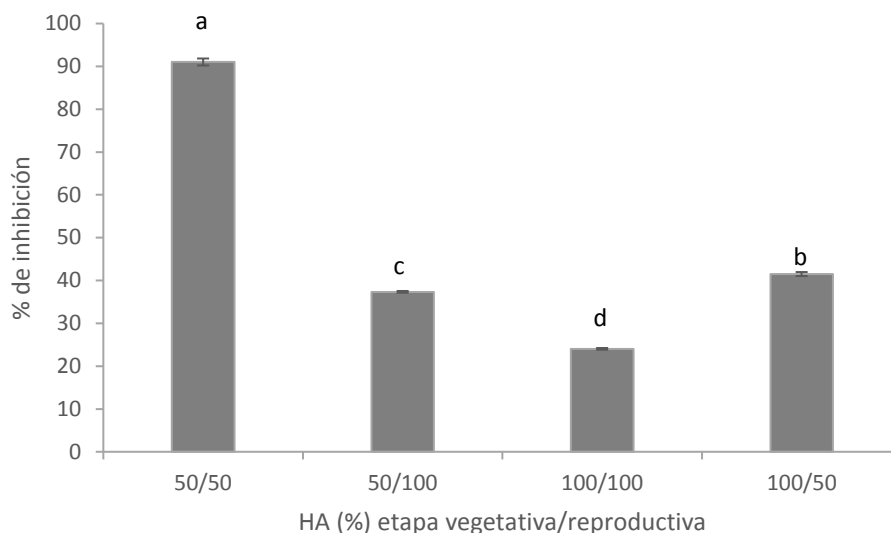


Figura 1. Capacidad de frijol sometido a diferentes niveles de humedad para inhibir la α -glucosidasa.

En contraste, la capacidad que tuvo el frijol obtenido de los diferentes tratamientos, para inhibir la α -glucosidasa fue cuantificable por todos los materiales analizados. Sin embargo, los tratamientos 50/50 y 100/50 fueron nuevamente más eficientes en la inhibición, en comparación con el resto de los tratamientos. Estos resultados sugieren que ambos tratamientos de humedad aparente del suelo permiten el incremento de metabolitos con capacidad para inhibir enzimas involucradas con el metabolismo de los carbohidratos, lo que pudiera sugerir que el déficit de humedad durante el crecimiento de las plantas de frijol permite cosechar semilla de frijol con un mayor efecto hipoglucemiante.

Los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar, letras diferentes entre barras indican diferencia significativa ($P < 0.05$) con la prueba de Tukey. HA, humedad aparente

Finalmente, en cuanto a la capacidad del frijol para inhibir la lipasa pancreática, la Figura 2 muestra que el tratamiento 100/100 fue el más sobresaliente con un porcentaje de inhibición cercano al 12% seguido del tratamiento 100/50. Esto indica que el déficit hídrico durante el completo ciclo de desarrollo de las plantas de frijol y durante la etapa reproductiva de las mismas reduce esta capacidad.

Estos resultados demuestran que los niveles de humedad y su interacción con la etapa de crecimiento de la planta están ampliamente relacionados con la síntesis de fitoquímicos que pudieran estar relacionados con este efecto. En previos trabajos del grupo de trabajo, se ha reportado que el suministro de agua de riego en el cultivo de frijol de la variedad Flor de Junio Dalia modifica la concentración de fenoles totales, flavonoides, taninos condensados y antocianinas (Herrera *et al.*, 2018a) y carbohidratos no digeribles como la fibra dietaria y el almidón resistente (Herrera *et al.*, 2018b), siendo en general los tratamientos 50/50 y 50/100 los que muestran mayor concentración de estos constituyentes, lo que pudiera explicar los datos obtenidos en su capacidad para inhibir las enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa. No obstante, se sugiere realizar estudios adicionales que impulsen la generación de información complementaria de la capacidad que tiene el déficit hídrico para mejorar la calidad funcional del alimento.

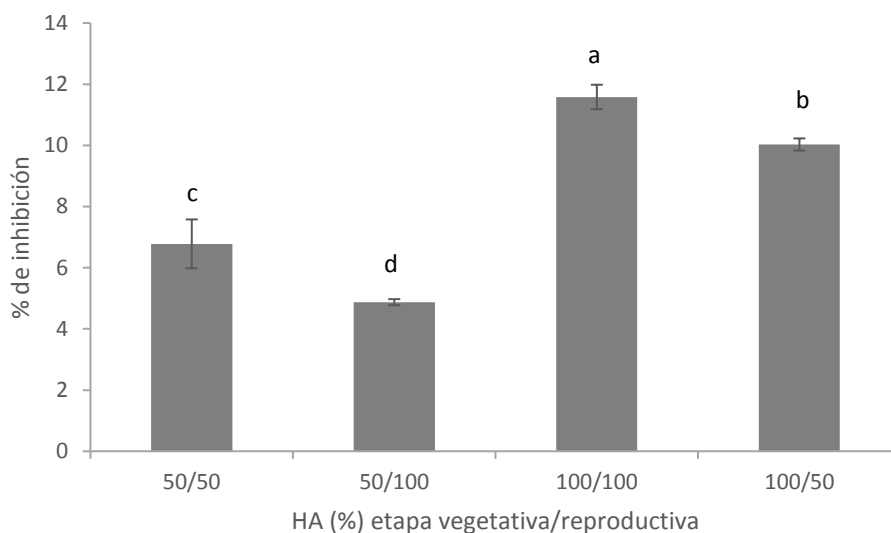


Figura 2. Capacidad de frijol sometido a diferentes niveles de humedad para inhibir la lipasa pancreática.

Los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar, letras diferentes entre barras indican diferencia significativa ($P < 0.05$) con la prueba de Tukey. HA, humedad aparente.

CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio demuestran que las condiciones de cultivo de cualquier producto agrícola afectan la calidad del alimento, es posible manipular dichas condiciones con el propósito de obtener productos de alta calidad funcional. En este sentido, la búsqueda de estrategias que además de mejorar la calidad, tengan por objetivo mejorar el paquete tecnológico en la producción agrícola es ampliamente recomendable, tal es el caso del suministro de agua de riego, ya que se puede optimizar la utilización de este recurso en el sector agrícola, y obtener alimentos con mayor beneficio al consumidor.

BIBLIOGRAFÍA

- Ali, M.H., Hoque, M.R., Hassan, A.A. & Khair, A., (2007). Effects of deficit irrigation on yield, water productivity, and economic returns of wheat. *Agricultural Water Management*, 92, 151–161.
- Apostolidis, E., Kwon, Y. & Shetty, K. (2007). Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science Emerging Technology*, 8, 46–54.
- Beebe, S., Rao, I.M., Blair, M.W. & Acosta-Gallegos, J.A. (2013). Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Frontiers in Physiology*, 4, 1-20.
- Cakir, R., 2004. Effect of water stress at different development stages on vegetative and reproductive growth of corn. *Field Crop Research* 89, 1–16.
- Fabeiro, C., Martín de Santa Olalla, F. & de Juan, J.A. (2001). Yield and size of deficit irrigated potatoes. *Agricultural Water Management*, 48, 255–266.
- Figuroa-Pérez, M.G., Rocha-Guzmán, N.E., Pérez-Ramírez, I.F., Mercado-Silva, E., Reynoso-Camacho, R. (2014). Metabolite profile, antioxidant capacity, and inhibition of digestive enzymes in infusions of peppermint (*Mentha piperita*) grown under drought stress. *Journal of Agricultural and Food Science*, 62, 12027-12033.

- G de Mejía, E., Martínez-Resendiz, V., Castaño-Tostado, E. & Loarca-Piña G. (2003). Effect of drought on polyamine metabolism, yield, protein content and in vitro protein digestibility in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) bean seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1022-1030.
- Herrera Hernández, M.G., Acosta Gallegos, J.A., Salinas Pérez, R.A., Bernardo Casas, A.M. & Guzmán Maldonado, S.H. (2014). Health-related components in plant bean seeds grown under irrigation and terminal drought stress. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5, 87-99.
- Herrera, M.D., Servín-Palestina, M. & Lozada-Carlos M.M. (2018). Changes on the non-digestible carbohydrates concentration of common bean in response to plant water supply. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*. In Press.
- Herrera, M.D., Servín-Palestina, M. & Lozada-Carlos M.M. (2018). Differential changes on the phenolic content of common bean grown under water restriction. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*. In Press.
- Jansen JJ, Allwood JW, Marden-Edward E, Van de Putten WH, Goodacre R. & Van Dam NM. (2009). Metabolic analysis of the interaction between plants and herbivores. *Metabolomics*, 5: 150-161.
- Jiang, Y., Yang, B., Harris, N.S. & Deyholos M.K. (2007). Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in Arabidopsis roots. *Journal of Experimental Botany*, 58, 3591–3607.
- Kandra, L., Zajacz, A., Remenyik, J. & Gyemant, G. (2005). Kinetic investigation of a new inhibitor for human salivary α -amylase. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*, 334, 824–828.
- Kigel J. Culinary and nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* seeds as affected by environmental factors. (1999). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 3, 205-209.
- McCarty, M.F. & Nicolantonio J.J. (2015). Acarbose, lente carbohydrate, and prebiotics promote metabolic health and longevity by stimulating intestinal production of GLP-1. *Open Heart*. 2, 205-2011.
- McDougall, G., Kulkarni, N. & Stewart, D. (2009). Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. *Food Chemistry*, 115, 193–199.
- Webber, H.A., Madramootoo, C.A., Bourgault, M., Horts, M.G., Stulina, G. & Smith DL. (2006). Water use efficiency of common bean and green gram grown using alternative furrow and deficit irrigation. *Agricultural Water Management*, 86: 259-268.
- Xu, B.J. & Chang, S.K.C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 2: 159-166.
- Zhang, R., Zhao, Y., Sun, Y., Lu, X. & Yang X. (2013). Isolation, characterization, and hepatoprotective effect of the raffinose family oligosaccharides from *Rehmannia glutinosa* Libosch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 7786-7793.