

Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos de péptidos de dos variedades de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*).

Teniente-Martínez, G^a., Valadez-Vega, Ma. C^b., González-Cruz, L^a., Cariño-Cortés R^b.,

Juárez-Goiz, JMS^a., Bernardino-Nicanor, A^{a*}

a Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Celaya, Departamento de Ingeniería Bioquímica. Av. Tecnológico y A. Gracia Cubas 600, C.P. 38010, Celaya, Guanajuato, México.

b Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud, ex hacienda la concepción, Tilcuaultla. Código Postal: 42160, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México.

[*aurea.bernardino@itcelaya.edu.mx](mailto:aurea.bernardino@itcelaya.edu.mx)

RESUMEN:

Actualmente, es de suma importancia la búsqueda de compuestos benéficos a la salud de origen natural con capacidad antioxidante ya que estos, además de nutrir pueden fungir como nutraceutico, tal es el caso de los péptidos bioactivos que son obtenidos de por hidrolisis enzimática y principalmente de las leguminosas, debido a que en ellas se han podido encontrar algunos péptidos con actividad antioxidante, por lo que el frijol ayocote podría ser una fuente promisoría de compuestos bioactivos sabiendo que puede tener hasta un 23%, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante de los péptidos generados por la hidrolisis enzimática del aislado proteínico de dos variedades de frijol ayocote (negro y morado). Los resultados obtenidos para la actividad antioxidante mostraron que los péptidos óptimos para la actividad antioxidante son los péptidos mayores a 30, ≤ 30 kDa y ≤ 10 kDa porque con ellos se utilizaron las concentraciones más pequeñas para alcanzar el IC₅₀.

ABSTRACT:

Currently, it is very important to search for health-beneficial compounds of natural origin with antioxidant capacity since these, in addition to nourishing can act as a nutraceutical, such is the case of bioactive peptides that are obtained by enzymatic hydrolysis and mainly by legumes, because they have been able to find some peptides with antioxidant activity, so that the ayocote bean could be a promising source of bioactive compounds knowing that it can tear up to 23%, so the objective of this work was To evaluate the antioxidant capacity of the peptides generated by the enzymatic hydrolysis of the protein isolate of two varieties of aubergine bean (black and purple). The results obtained for the activated antioxidant showed that the optimal peptides for the antioxidant activity are the peptides greater than 30, ≤ 30 kDa and ≤ 10 kDa because with them the smaller concentrations were used to reach the IC₅₀.

Palabras clave:

Antioxidante, frijol ayocote, *Phaseolus coccineus*, bioactivos, péptidos.

Key words:

Antioxidant, ayocote bean, *Phaseolus coccineus*, bioactive, peptides.

Área: Nutrición y nutraceuticos.

INTRODUCCIÓN

A nivel industrial hay un excesivo uso de antioxidantes sintéticos incorporados en los alimentos, sin embargo muchos de estos ya se han ido restringiendo a causa del potencial riesgos que representan para la salud humana (HRAŠ *et al.*., 2000), por lo que es cada vez mayor el interés de encontrar sustancias de origen natural con características antioxidantes, sabiendo que pueden existir una infinidad de compuestos con dicha actividad tales como los compuestos fenólicos, además de algunas proteínas, péptidos y aminoácidos que ya se han identificado (Baydar *et al.*, 2007; Rajapakse *et al.*, 2005); hablando específicamente de las proteínas estas poseen una capacidad para inhibir la oxidación mediante la acción de distintos residuos de aminoácidos y secuencias de péptidos que participan en las reacciones de oxidación en las que están involucradas diferentes especies oxidantes y

ambientes moleculares, lo que los convierte un componente importante de los sistemas alimentarios al representar un medio de defensa antioxidante en tejidos biológicos (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2016).

Los péptidos bioactivos son unos de estos compuestos que se han reportado con esta actividad, estos son obtenidos mediante hidrólisis enzimática, utilizando enzimas comerciales (alcalasa, flavourzima, pepsina, pancreatina, tripsina, quimotripsina, neutrasa, etc.) a diferentes tiempos de hidrólisis, relaciones enzima/sustrato y pH y temperaturas específicas de la enzima (Alashi *et al.*, 2014; Onuh *et al.*, 2014; Ahn *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012; Fritz *et al.*, 2011). Sin embargo Je *et al.*, 2005, menciona que las condiciones operacionales empleadas en el procesamiento de aislados proteicos, el tipo de proteína y el grado de hidrólisis pueden afectar considerablemente la actividad biológica así como su capacidad antioxidante.

Tomando en cuenta que se ha reportado que el frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*) contiene hasta 23% de proteína (Teniente-Martínez *et al.*, 2016) lo convierte en una fuente promisoría de péptidos bioactivos con actividad antioxidante. Por lo tanto este estudio se enfocó en determinar la capacidad antioxidante de los grupos de péptidos generados por la hidrólisis enzimática del aislado proteínico de dos variedades de frijol ayocote.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de los aislados proteínicos del frijol ayocote

El aislamiento de las proteínas se realizó de acuerdo a la metodología de precipitación isoelectrica reportada por Teniente-Martínez *et al.*, 2016, el cual consiste de dos etapas: en la primera se determina el pH de máxima solubilidad de las proteínas y en la segunda se determina el pH de máxima precipitación. Se preparó una disolución con harina de frijol y agua destilada en una relación 1:14 (p/v), se ajustó a pH 11.8 con NaOH (0.1N) y se agito por 45 min. a 37°C, posteriormente se centrifugo a 3000 rpm (30 minutos; 4°C), se separó el sobrenadante y se ajustó a pH 4, para obtener la máxima solubilidad (punto isoelectrico de frijol ayocote) se bajó la temperatura hasta 4°C y se centrifugo a 6000 rpm por 30 minutos, en pellet se secó a 50 °C.

Hidrólisis de los aislados.

Los aislados proteínicos se hidrolizaron por un tratamiento secuencial con pepsina, pancreatina, de acuerdo al método establecido por Mora-Escobedo *et al.*, 2009. El aislado proteínico (2.5g de aislado en 50 mL de agua destilada) se ajustó a pH 2 con HCl 1.0 N y se digirió con 100 mg de pepsina (E/S= 1/25) por 60 minutos a 37°C, Posteriormente se ajustó el pH a 5.3 con NaHCO₃ 0.9 M y se adicono 100 mg de pancreatina (E/S= 1/20) y se ajustó nuevamente el pH a 7.5 con NaOH 1 N se dejó digerir durante 120 minutos a 37°C. Después, la muestra se sumergió durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo para detener la digestión.

Separación de las fracciones peptídicas mediante ultrafiltración

Los hidrolizados proteínicos se centrifugaron a 10,000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante con las fracciones solubles se utilizó para la separación por ultrafiltración. Se utilizó una unidad de ultrafiltración la cual está equipada con un agitador magnético para evitar el sedimento de la muestra sobre las membranas. Se utilizaron cinco membranas con diferentes cortes de peso molecular (MWCO): 30000 (30kDa), 10000 (10 kDa); 5000 (5 kDa); 3000 (3 kDa) y 1000 (1 kDa). Se obtuvieron con ello seis fracciones peptídicas y estas se denominaron como: A (peso molecular > 30 kDa), B (peso molecular entre 30 y 10 kDa), C (peso molecular entre 10 y 5 kDa), D (peso molecular entre 5 y 3 kDa), E (peso molecular entre 3 y 1 kDa) y F (peso molecular 1 y < 1 kDa) (Cho y col. 2004). Las fracciones se liofilizaron.

Determinación de la actividad antioxidante

Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizó la técnica de DPPH (1,1-difenil-2 picrilhidrazil) descrita por Brand-Williams, 1995, que consiste en preparar una curva de calibración con una disolución de DPPH 0.1 mM en metanol (80 %), para ello se realizaron cinco disoluciones en concentraciones de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 mM, contando con un blanco, el cual sólo contenía 10 mL del disolvente, para la determinación de la actividad antioxidante de las muestras se utilizaron 1.95 mL de la disolución de DPPH 0.1 mM y 0.05 mL

del extracto leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm, cada 10 minutos hasta completar 60 minutos.

Determinación de contenido de fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales se utilizó la técnica de Folin-Ciocalteu adaptada para alimentos por Singleton *et al.*, 1999. Esta técnica consiste en realizar una curva de calibración a partir de una disolución madre de ácido gálico (GAE), de 0 a 5 mg/L. Los resultados se reportan en mg de GAE/g de extracto. De cada disolución se tomaron 1.58 mL (1580 µL) y se mezclaron con 100 µL de reactivo Folin-Ciocalteu, se dejaron reposar por 8 minutos, posteriormente se agregaron 300 µL de disolución de Na₂CO₃ (20%), se agito hasta su completa homogeneización y se dejó reposar por 2 horas a 20°C (o por 30 minutos a 40°C, o bien por 15 min a 50°C), pasado este tiempo se leyó la absorbancia a 765 nm, usando como blanco la disolución de etanol al 10% . Esto se repite pero ahora con las muestra a analizar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de los aislados proteínicos del frijol

Los aislados proteínicos se obtuvieron mediante la técnica del punto isoeléctrico, obteniendo que estos contienen un 83.72% de proteína para el frijol morado y un 90.8% para el frijol negro, estos datos obtenidos son menores que los portados por Boye *et al.*, 2010 donde reporta un 95.70% de proteína en el aislado para el frijol lima (*P. lunatus*), sin embargo son altos comparados por lo obtenido por Conde-Martínez y Ortega-Delgado, 1990 y Medina-Godoy *et al.*, 2009 quienes reportan 66.73% de proteína en el aislado de frijol azufrado regional 87 (*P. vulgaris*). Estas diferencias nos indican que el rendimiento del aislado proteínico depende de la variedad y de los reactivos que sean utilizados para la obtención del mismo.

Determinación de la Actividad antioxidante

El hidrolizado proteínico fue separado en seis fracciones a través de las membranas de corte de 1, 3, 5, 10 y 30 kDa. Las fracciones fueron liofilizadas. Por otra parte en la tabla 1 se muestran los valores del IC₅₀ para la actividad antioxidante de los grupos de péptidos de ambos frijoles, se observó que la menor concentración utilizada fue para los péptidos mayores a 30 kDa, siendo estos lo de menor solubilidad comparado con los otros péptidos, que de acuerdo a Ajibola *et al.*, 2011 menciona que los pépticos con mayor cantidad de aminoácidos hidrofóbicos son lo que presenta mayor actividad antioxidante, por lo que a mayor concentración de péptido menor capacidad antioxidante. De acuerdo a lo anterior los péptidos óptimos para la actividad antioxidante son los péptidos mayores a 30, ≤30 kDa y ≤10 kDa ya fueron en los que utilizaron las concentraciones más pequeñas. Tang *et al.*, 2009, reporta resultados similares a los encontrados en las dos variedades de frijol ayocote que el menciona que las fracciones peptídicas obtenidas de hidrolizados de zeína la actividad de captar radicales DPPH es dependiente del peso molecular de la fracción, además de encontrar que las fracciones con mayor hidrofobicidad fueron las que tuvieron mayor actividad.

Tabla 1. Concentraciones del IC₅₀ de ambas variedades de frijol ayocote, para la activad antioxidante.

Péptidos (kDa)	IC ₅₀ (mg/mL)	
	Negro	Morado
≤ 1	96.2	82
≤3	45.6	21.6
≤5	34.4	16.3
≤10	18.6	10.5
≤30	5.8	4
>30	4.4	2.6

Determinación de fenoles totales

La técnica de fenoles fue realizada para confirmar la presencia de aminoácidos o péptidos con actividad antioxidante, los resultados se presentan la Tabla 2 donde se puede observar que la mayor cantidad de mg de GAE/g de muestra, se obtuvieron en los péptidos de mayor tamaño esto para las dos variedades de frijol ayocote (negro y morado). Lo que nos indica de acuerdo a su solubilidad es que probablemente estos péptidos contengan más aminoácidos hidrofóbicos, ya que Gallegos-Tintoré *et al.*, 2013, menciona que los péptidos responsable del efecto antioxidante son principalmente aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos tales como valina, leucina, triptófano, histidina, prolina, tirosina, metionina y cisteína.

Tabla 2. Determinación de fenoles totales en dos variedades de frijol ayocote, negro y morado.

Péptidos (kDa)	mg AG/g de extracto seco)	
	Negro	Morado
≤ 1	33.0	34.4
≤ 3	36.3	38.8
≤ 5	34.4	40.7
≤ 10	35.6	50.6
≤ 30	53.9	74.5
> 30	65.6	98.7

CONCLUSIÓN

Los péptidos que presentaron la mejor actividad antioxidante fueron los de ≤10, ≤30 y >30 kDa, con una concentración máxima de 20000 µg/mL.

AGRADECIMIENTOS:

Se agradece el apoyo financiero otorgado por el Tecnológico Nacional de México para el desarrollo del proyecto 6244.17-P.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, C. B., Je, J. Y., & Cho, Y. S. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. *Food Research International*, 49(1), 92-98.
- Ajibola, C. F., Fashakin, J. B., Fagbemi, T. N., & Aluko, R. E. 2011. Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 6685–6702.
- Alashi, A. M., Blanchard, C. L., Mailer, J. R., Agboola, S., Mawson, J. A., He, R., Girgih, A., & Aluko, R. E. (2014). Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 146(1), 500-506.
- Baydar, O' zkan, N., G. and Yasar, S., (2007). Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control*. 18, 1131–1136.
- Cho, J. M.; Unklesbay, N.; Hsieh, F-H., y Clarke, D. A. (2004). Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5895-5901.
- Conde-Martínez, V. y Ortega-Delgado, M. L., (1990). Obtención de aislados proteínicos y determinación de almidón en frijol (*Phaseolus vulgaris*L.) Endurecido por el almacenamiento. *Agrociencia serie fitociencia*. 1, 175-187.
- Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G., & Añón, M. (2011). Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chemistry*, 126(3), 878-884.

- Gallegos-Tintoré, S.M., Chel-Guerrero, L., & Martínez-Ayala, A.L. (2013). Péptidos con actividad antioxidante de proteínas vegetales. En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero & D. Betancur Ancona (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias*. 111-122.
- Hraš, A.R., Hadolin, M., Knez, Z. and Bauman, D., (2000). Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chem.* 71,229-233
- Je, Y., Park, P.Y. and Kim, S.K., (2005). Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate,” *Food Res Int.* 38, 45–50.
- Marcuse, R., (1960). Antioxidative effect of amino acids. *Nature.* 186, 886-887
- Medina-Godoy, S., Camacho-Espinoza, M.K., Peinado-Guevara L.I., López –Valenzuela J.A., Valdez-Ortiz A., Salinas-Pérez R.A. y Moreno- Herrera C.G. (2010). Caracterización Proteómica de Granos de Frijol Azufrado (*Phaseolus vulgaris*) Cultivados en el Estado de Sinaloa. *Ra Ximhai.* 6(1), 23-36. ISSN-1665-044.
- Mora-Escobedo, R., Robles-Ramírez, M. C., Ramón-Gallegos, E., y Reza-Alemán, R. (2009). Effect of Protein Hydrolysates from Germinated Soybean on Cancerous Cell of the Human Cervix: An *In Vitro* Study. *Plant Foods Hum Nutr.* 64,271–278
- Onuh, J. O., Girgih, A. T., Aluko, R. E., & Aliani, M. (2014). Inhibitions of renin and angiotensin converting enzyme activities by enzymatic chicken skin protein hydrolysates. *Food Research International*, 53(1), 260-267.
- Rajakapase, N., Mendis, E., Jung, W. K., Je, J. Y. and Kim, S.K., (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties,” *Food Research International.* 38,175–182.
- Sánchez-Mendoza, N.A., Cruz-Castellanos, M., Dávila-Ortiz, G., & Jiménez-Martínez, C. (2016). Péptidos con actividad antioxidante provenientes de fuentes animales y vegetales. En M.E. Ramírez Ortiz (Ed.). *Alimentos Funcionales de Hoy*. Barcelona, España: OmniaScience.117-142.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.
- Tang, C. H., Chen, L., & Ma, C. -Y. (2009). Thermal aggregation, amino acid composition and in vitro digestibility of vicilin-rich protein isolate from three *Phaseolus* legumes: A comparative study. *Food Chemistry*, 113, 957–963.
- Tang, C.-H.; Wang, X.-S.; Yang, X.-Q., (2009). Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis Sativa* L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chem.* 114, 1484–1490.
- Teniente-Martínez, G., González-Cruz, L., Cariño-Cortés, R. y Bernardino-Nicanor, A. (2016). Caracterización de las proteínas de frijol ayocotes. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos.* 1(1),1-6
- Zhao, Q., Selomulya, C., Xiong, H., Chen, X. D., Ruan, X., Wang, S., Xie, J., Peng, H., Sun, W., & Zhou, Q. (2012). Comparison of functional and structural properties of native and industrial process-modified proteins from long-grain indica rice. *Journal of Cereal Science*, 56(1), 568-575.
- Todas las referencias en el texto deberán aparecer en esta sección y viceversa. Es necesario notar que los títulos de las revistas no se abrevian, que hay espacios entre las iniciales y que se deben nombrar todos los autores. Si una cita bibliográfica incluye a más de dos autores, debe referenciarse mencionando el primer apellido del primer autor, seguido de “*et al.*” y el año de publicación. Por ejemplo: Reid *et al.* (1999). Se anotarán en orden alfabético utilizando el siguiente formato: De publicaciones periódicas: Autor(es) comenzando con el apellido e iniciales del nombre en mayúsculas, año, título del artículo, revista (en cursivas), volumen, número, páginas. Libros especializados: Autor(es) con el apellido e iniciales del nombre en mayúsculas, año, título del capítulo consultado seguido de “En (Título del libro, editado por: Nombre de editores)”, editorial, páginas consultadas. Sólo en caso estrictamente indispensable citar sitios de la red.
- Bibliografía (ejemplo)**
- de Vust, L., & Vandamme, E. (1994). Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. En *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, Editado por L. de Vust, & E. J. Vandamme. Londres: Blackie Academic and Professional, pp. 152- 159.
- Martín, A., Serrano, S., Santos, A., Marquina, D., & Vázquez, C. (2010). Bioluminiscencia bacteriana. *Reduca*, 3 (5), 75-86.