

MCA-2017/10

**S.E.P.** TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

# INSTITUTO TECNOLÓGICO de Tuxtepec

**“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES  
PEPTÍDICAS DE DOS VARIETADES DE FRIJOL Y SU  
EVALUACIÓN COMO COMPONENTES BIOACTIVOS”**

## TESIS

Para Obtener el título de:  
**MAESTRA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**

PRESENTA

**QC. SHUNASHI DEL CARMEN ARMAS LUNA**

DIRECTOR:

**DR. JUAN GABRIEL TORRUCO UCO**

CO-DIRECTORA:

**DRA. CECILIA EUGENIA MARTÍNEZ SÁNCHEZ**

TUXTEPEC, OAXACA, DICIEMBRE 2017

## **COMITÉ TUTORIAL**

**DR. JUAN GABRIEL TORRUCO UCO**  
**DRA. CECILIA EUGENIA MARTÍNEZ SÁNCHEZ**  
**DR. JESUS RODRÍGUEZ MIRANDA**  
**MC. ERNESTINA PAZ GAMBOA**

**SEP**

**TECNM**

**SNEST**

**INSTITUTO TECNOLÓGICO  
de Tuxtepec**



**“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
FRACCIONES PEPTÍDICAS DE DOS VARIEDADES  
DE FRIJOL Y SU EVALUACIÓN COMO  
COMPONENTES BIOACTIVOS”**

**TESIS**

**Para Obtener el Grado de**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

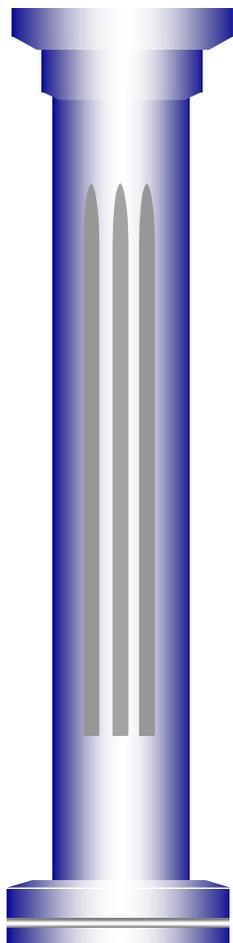
**Q.C. SHUNASHI DEL CARMEN ARMAS  
LUNA**

**DIRECTOR:**

**DR. JUAN GABRIEL TORRUCO UCO**

**CO-DIRECTORA:**

**DRA. CECILIA EUGENIA MARTÍNEZ SÁNCHEZ**



**TUXTEPEC, OAXACA, MÉXICO**

**DICIEMBRE 2017**

"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA  
División de Estudios Profesionales

Procedimiento para la Titulación  
**Autorización de Presentación del Trabajo Profesional**  
Referencia a la Norma ISO 9001:2008 7.5.1

SUBDIRECCION ACADÉMICA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
EXPEDIENTE: DEP-ñ/17

Tuxtepec, Oaxaca. **28/NOVIEMBRE/2017**  
OFICIO: No. 4824

**Q.C. SHUNASHI DEL CARMEN ARMAS LUNA**  
**EGRESADA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**  
**CON NÚMERO DE CONTROL M15350011**  
**PRESENTE.**

POR MEDIO DE LA PRESENTE ME PERMITO COMUNICARLE QUE LA COMISIÓN REVISORA INTEGRADA POR LOS C.C. **DR. JUAN GABRIEL TORRUCO UCO, DRA. CECILIA EUGENIA MARTÍNEZ SÁNCHEZ, DR. JESÚS RODRÍGUEZ MIRANDA Y M.C. ERNESTINA PAZ GAMBOA** REVISÓ Y APROBÓ EN SU TOTALIDAD EL TRABAJO PROFESIONAL DENOMINADO "**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES PEPTÍDICAS DE DOS VARIETADES DE FRIJOL Y SU EVALUACIÓN COMO COMPONENTES BIOACTIVOS**" PRESENTADO POR USTED COMO PRODUCTO DE **TESIS** DEL LINEAMIENTO DE TITULACIÓN CORRESPONDIENTE, PARA OBTENER EL GRADO DE **MAESTRA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**.

POR LO ANTERIOR Y DE ACUERDO A LOS LINEAMIENTOS INSTITUCIONALES, SE LE DA TRÁMITE LEGAL PARA QUE PROCEDA A LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO PROFESIONAL.

**ATENTAMENTE**  
"CIENCIA Y TÉCNICA PRESENTES AL FUTURO"

**L.I. MARTHA MÓNICA HERNÁNDEZ CRUZ**  
**JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES.**

C.c.p.-Coord. de titulación  
MMHC/has



SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE TUXTEPEC  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
PROFESIONALES



Av. Dr. Víctor Bravo C.P. 68350 Col. 5 de Mayo Tuxtepec, Oaxaca  
Teléfono: (287) 87 5 10 44 Ext. 103, Fax: (287) 87 5 18 80  
e-mail: [info@ittux.edu.mx](mailto:info@ittux.edu.mx)



REGISTRO SGC  
Código ITTUX-AC-PO-008  
Revisión:  
Fecha de Autorización: 19/Junio/2018

Proceso Educativo: Que comprende desde la inscripción hasta la entrega de título y cédula profesional de licenciatura.

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES PEPTÍDICAS DE DOS  
VARIETADES DE FRIJOL Y SU EVALUACIÓN COMO COMPONENTES  
BIOACTIVOS**

**Por:**

**Q.C. SHUNASHI DEL CARMEN ARMAS LUNA**

**Protocolo de Tesis Propuesta al**

**Instituto Tecnológico de Tuxtepec**

**Como requerimiento parcial para obtener el grado de**

**Maestro en Ciencias en Alimentos**

**Diciembre del 2017**

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo de tesis fue realizado bajo la dirección y supervisión del Dr. Juan Gabriel Torruco Uco, a quien expreso mi agradecimiento por haber hecho posible la realización exitosa de esta investigación. Muchas gracias por su apoyo.

A mi comité tutorial integrado por la Dra. Cecilia Eugenia Martínez Sánchez, el Dr. Jesús Rodríguez Miranda y la M.C. Ernestina Paz Gamboa, por tomar parte de su tiempo en la revisión y corrección de este trabajo de investigación.

A los profesores investigadores que imparten clases en la Maestría en Ciencias en Alimentos del Instituto Tecnológico de Tuxtepec, por haberme brindado su conocimiento y consejos para guiarme en mi formación como Maestra en Ciencias.

A mis compañeros de generación, por compartir esta experiencia de la vida conmigo y por la amistad incondicional que me brindaron.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber financiado mis estudios de Maestría en Ciencias en Alimentos en esta Institución.

## DEDICATORIA

A mi madre, **Teresa Luna López**, mi ángel personal; por ser mi motor y enseñarme a luchar por lo que quiero. Porque desde su lugar junto al Creador se sienta orgullosa de la persona en la que me he convertido.

A mi padre, **Pedro Armas Altamirano**; quien me apoyó incondicionalmente mientras duró esta aventura.

A mis hermanos: **Carlos, Pedro e Iván** por estar siempre que los he necesitado. Gracias por los consejos y regaños.

A **Alessandra y Paulette** quienes me impulsan a ser mejor cada día, por motivarme a ser su ejemplo a seguir; nunca dejarán de ser mis bebés.

A mis **amigos**, a quienes han estado conmigo siempre, a quienes se quedaron en el camino y a los que se agregaron a él; mil gracias por las risas y lágrimas compartidas; por ayudarme a seguir cuando ya no podía; sin duda alguna, la mejor familia que podría elegir.

## RESUMEN

Armas Luna, S. C. M en C. Instituto Tecnológico de Tuxtepec. Diciembre, 2017. “Obtención y caracterización de fracciones peptídicas de dos variedades de frijol y su evaluación como componentes bioactivos”. Director: Dr. Juan Gabriel Torruco Uco, Co-directora: Dra. Cecilia Eugenia Martínez Sánchez.

La contaminación ambiental y la exposición al sol generan la formación de radicales libres en el organismo y éstos son los responsables de la oxidación celular; por otro lado, el consumo de alimentos ricos en azúcares y mala higiene bucal provocan la desmineralización del esmalte dental. La especie *Phaseolus vulgaris* es una fuente rica en proteínas, por lo que podría ser una alternativa para la obtención de componentes bioactivos. El objetivo de este trabajo fue obtener y caracterizar fracciones peptídicas de frijol flor de mayo y frijol pinto (*Phaseolus vulgaris*) y evaluarlos como componentes bioactivos. Se obtuvo una harina y concentrado proteínico a partir de los granos del frijol flor de mayo y pinto y se realizó el análisis químico proximal y de color. Los concentrados fueron hidrolizados secuencialmente utilizando las enzimas Pepsina® y Pancreatina®, a los hidrolizados obtenidos se les evaluó la actividad antioxidante por los métodos ABTS• y DPPH• y la actividad anticariogénica mediante el uso de hidroxiapatita y buffer de acetato de sodio. Los hidrolizados a 60 min fueron fraccionados mediante ultrafiltración utilizando una membrana con un corte molecular de 10 kDa. A las fracciones obtenidas se les evaluaron las actividades antes mencionadas. Las harinas presentaron valores de proteínas de 17.86 y 17.9 respectivamente, mientras en los concentrados proteínicos estos valores fueron de 73.19 y 79.21. En cuanto al análisis de color, las harinas presentaron mayor luminosidad ( $L^* = 87.14$  y  $L^* = 87.38$  respectivamente) que los concentrados proteínicos ( $L^* = 70.64$  y  $L^* = 74.29$  respectivamente). El frijol flor de mayo logró un grado de hidrólisis de 30.55% a 60 min y en el frijol pinto éste fue de 37.78% a 50 min de reacción. La fracción  $> 10$  kDa de frijol flor de mayo presentó mayor porcentaje de actividad antioxidante, mientras que la fracción  $< 10$  kDa de la misma variedad obtuvo el mayor

porcentaje de reducción de desmineralización de Calcio (90.94%). Estas fuentes son aptas para la obtención de fracciones peptídicas que contengan péptidos bioactivos que presenten actividades biológicas, las cuales aumentan su eficacia al ser separadas mediante ultrafiltración.

## ABSTRACT

Armas Luna, S. C. Master in Food Science. Instituto Tecnológico de Tuxtepec. December, 2017. "Obtainment and characterization of peptide fractions of two bean varieties and their evaluation as bioactive compounds". Advisor: Dr. Juan Gabriel Torruco Uco, Co-advisor: Dra. Cecilia Eugenia Martínez Sánchez.

Environmental pollution and sun exposure generate the formation of free radicals in the body and these are responsible for cellular oxidation; more over, the consumption of foods rich in sugars and poor oral hygiene causes the demineralization of tooth enamel. The species *Phaseolus vulgaris* is a rich source of proteins, so it could be an alternative for obtaining bioactive components. The objective of this work was to obtain and characterize peptide fractions of May flower bean and Pinto bean (*Phaseolus vulgaris*) and evaluate them as bioactive compounds. A flour and protein concentrate was obtained from the beans of the May flower and pinto and the proximal and color chemical analysis was carried out. The concentrates were hydrolyzed sequentially using the enzymes Pepsina® and Pancreatina®, the hydrolysates obtained were evaluated for antioxidant activity by the ABTS • and DPPH • methods and the anticariogenic activity by the use of hydroxyapatite and sodium acetate buffer. The hydrolysates at 60 min were fractionated by ultrafiltration using a membrane with a molecular weight cut-off 10 kDa. The aforementioned activities were evaluated for the peptide fractions. The flours presented protein values of 17.86 and 17.9 respectively, while in the protein concentrates these values were 73.19 and 79.21. Regarding the color analysis, the flours presented higher brightness ( $L^* = 87.14$  and  $L^* = 87.38$  respectively) than the protein concentrates ( $L^* = 70.64$  and  $L^* = 74.29$  respectively). May flower beans obtained a degree of hydrolysis of 30.55% at 60 min and pinto beans was 37.78% after 50 min of reaction. The May flower beans > 10 kDa fraction presented a higher percentage of antioxidant activity, while the fraction <10 kDa of the same variety obtained the highest percentage of calcium demineralization reduction (90.94%). These sources are suitable for obtaining peptide fractions containing bioactive elements that present biological activities, which increase their effectiveness when separated by ultrafiltration.

## CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| I INTRODUCCIÓN .....   | 1  |
| II MARCO TEÓRICO .....   | 3  |
| 2.1 Proteínas .....  | 3  |
| 2.2 Proteínas de la dieta .....  | 4  |
| 2.3 Leguminosas.....   | 5  |
| 2.3.1 Frijoles.....  | 8  |
| 2.4 Fracciones peptídicas.....   | 13 |
| 2.4.1 Péptidos bioactivos .....  | 14 |
| 2.4.2 Actividad biológica de los péptidos.....   | 20 |
| III ANTECEDENTES .....   | 26 |
| IV JUSTIFICACIÓN.....  | 29 |
| V OBJETIVOS.....   | 30 |
| 5.1 Objetivo general .....   | 30 |
| 5.2 Objetivos específicos.....   | 30 |
| VI MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 31 |
| 6.1 Obtención de la materia prima.....   | 31 |
| 6.2 Obtención de la harina de frijol flor de mayo y frijol pinto .....                                       | 31 |
| 6.3 Obtención del concentrado proteínico .....   | 31 |
| 6.4 Composición proximal de la harina y el concentrado proteínico de frijol flor de mayo y frijol pinto..... | 32 |
| 6.6 Hidrólisis del concentrado proteínico .....  | 33 |
| 6.7 Determinación del grado de hidrólisis .....  | 33 |
| 6.8 Determinación de la actividad antioxidante.....  | 34 |
| 6.8.1 Método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•).....  | 34 |
| 6.8.2 Método 2,2,-azino-bis-(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfónico) o ABTS• .....                                | 35 |
| 6.9 Determinación de actividad anticariogénica .....   | 35 |
| 6.10 Obtención de las fracciones peptídicas por ultrafiltración .....  | 36 |
| 6.13 Análisis estadístico .....  | 36 |
| VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 37 |

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| 7.1 Caracterización proximal de la harina y concentrado proteínico de frijol flor de mayo y frijol pinto..... | 37                                   |
| 7.2 Color de la harina y concentrado proteínico de frijol flor de mayo y frijol pinto. ....                   | 41                                   |
| 7.3 Hidrólisis del concentrado proteínico de frijol flor de mayo y frijol pinto. ....                         | 43                                   |
| 7.4 Actividad antioxidante.....   | 47                                   |
| 7.4.1 Actividad antioxidante de las fracciones peptídicas separadas por ultrafiltración.....                  | 49                                   |
| 7.5 Actividad anticariogénica .....   | 55                                   |
| 7.5.1 Actividad anticariogénica de las fracciones peptídicas separadas por ultrafiltración .....              | 56                                   |
| Referencias .....   | <b>¡Error! Marcador no definido.</b> |

## LISTA DE TABLAS

|  | <i>Pág.</i> |
|--|-------------|
| <i>Tabla 1. Composición química proximal, contenido de minerales y vitaminas en distintos tipos de leguminosas. ....</i>           | <i>8</i>    |
| <i>Tabla 2. Producción de frijol en México .....</i>   | <i>10</i>   |
| <i>Tabla 3. Técnicas mayormente usadas para purificación e identificación de péptidos bioactivos. ....</i>                         | <i>15</i>   |
| <i>Tabla 4. Principales enzimas comerciales utilizadas en la obtención de péptidos con diferentes actividades biológicas. ....</i> | <i>19</i>   |
| <i>Tabla 5. Péptidos biológicamente activos y sus efectos en el organismo. ....</i>  | <i>21</i>   |
| <i>Tabla 6. Actividades antioxidantes mostradas de diferentes hidrolizados de proteínas.....</i>                                   | <i>23</i>   |
| <i>Tabla 7. Composición química proximal de las harinas y concentrados proteínicos de frijol flor de mayo y frijol pinto.....</i>  | <i>38</i>   |
| <i>Tabla 8. Color de la harina y concentrado proteínico de frijol flor de mayo y frijol pinto.....</i>                             | <i>42</i>   |

**LISTA DE FIGURAS**

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| <i>Figura 1. Partes de la semilla de frijol</i> .....   | 9           |
| <i>Figura 2. Granos de frijol Flor de Mayo</i> .....  | 11          |
| <i>Figura 3. Molécula de antocianina o flavonoide</i> .....   | 12          |
| <i>Figura 4. Granos de frijol pinto</i> .....   | 13          |
| <i>Figura 5. Clasificación de enzimas según su actividad catalítica</i> .....   | 18          |
| <i>Figura 6. Hidrólisis enzimática del concentrado proteínico de frijol flor de mayo con sistema secuencial Pepsina-Pancreatina</i> ..... | 44          |
| <i>Figura 7. Hidrólisis enzimática del concentrado proteínico de frijol pinto con sistema secuencial Pepsina-Pancreatina</i> .....        | 45          |
| <i>Figura 8. Actividad antioxidante ABTS• del hidrolizado proteínico a 60 min de frijol flor de mayo y frijol pinto</i> .....             | 48          |
| <i>Figura 9. Actividad antioxidante DPPH• del hidrolizado proteínico a 60 min de frijol flor de mayo y frijol pinto</i> .....             | 49          |
| <i>Figura 10. Actividad antioxidante ABTS• de las fracciones peptídicas &lt; 10 kDa de frijol flor de mayo y frijol pinto</i> .....       | 50          |
| <i>Figura 11. Actividad antioxidante ABTS• de las fracciones peptídicas &gt; 10 kDa de frijol flor de mayo y frijol pinto</i> .....       | 51          |
| <i>Figura 12. Actividad antioxidante DPPH• de las fracciones peptídicas &lt; 10 kDa de frijol flor de mayo y frijol pinto</i> .....       | 53          |
| <i>Figura 13. Actividad antioxidante DPPH• de las fracciones peptídicas &gt; 10 kDa de frijol flor de mayo y frijol pinto</i> .....       | 54          |
| <i>Figura 14. Actividad anticariogénica de los hidrolizados proteínicos a 60 min de frijol flor de mayo y frijol pinto</i> .....          | 55          |
| <i>Figura 15. Actividad anticariogénica de las fracciones peptídicas de frijol flor de mayo y frijol pinto</i> .....                      | 57          |

## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el estilo de vida agitado y los hábitos alimenticios inadecuados han llevado a la generación de radicales libres, los cuales pueden afectar de diferentes maneras al ser humano, causando diversas enfermedades y padecimientos.

Las especies de oxígeno reactivo y otros radicales libres producen daño oxidativo al ADN, proteínas y otras macromoléculas tales como lípidos. En la medida en que las especies de oxígeno reactivo están implicadas en la etiología de muchas enfermedades multifactoriales degenerativas como la diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos y, en general, el envejecimiento por lo que el interés en la investigación sobre el uso de antioxidantes naturales para su prevención y tratamiento ha aumentado (Ames et al.,1993).

Así mismo, de acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 5 mil millones de personas padecen caries dental, lo que equivale aproximadamente a un 80% de la población mundial; en América Latina el porcentaje se incrementa al 96% de la población (González-Sánchez et al., 2009). Datos de la Encuesta Nacional de Caries 1997-2001, indican que entre el 85 y 95% de la población infantil y juvenil presenta uno o varios órganos dentarios afectados por los procesos cariosos (Canseco, 2001).

Estos padecimientos pueden ser corregidos por medio de tratamientos odontológicos, los cuales resultan poco accesibles sobre toda para ciertos estratos socioeconómicos de la población (Canseco, 2001). Debido a lo cual cobra mayor importancia la prevención de dichas patologías, sobre todo desde el punto de vista dieta-salud.

Tomando en cuenta estos problemas de salud humana, se han generado necesidades y oportunidades que pueden ser aprovechados por la Ciencia de los Alimentos, para el diseño de alimentos específicos provenientes de diferentes materias primas, que pueden fungir como promotores de la salud, es decir, alimentos funcionales (Korhonen, 2002). En este sentido las proteínas y péptidos con actividad biológica constituyen una de las categorías más importantes dentro del sector de los alimentos funcionales (Segura-Campos et al., 2013a). En los últimos años, el estudio de los péptidos bioactivos presentes en las secuencias de las proteínas de los alimentos, ha recibido una gran atención desde el punto de vista funcional debido a que presentan diversas actividades biológicas, por ejemplo,

funciones antihipertensivos, opioides, antioxidantes, anticolesterolémicos, antimicrobianos, anticariogénicos, antitrombóticos, anticancerígenos e inmunomoduladores. Tales péptidos son inactivos dentro de las proteínas precursoras y pueden ser liberados por proteólisis enzimática (Vioque et al., 2000).

Debido a lo anterior, en el presente trabajo de investigación se evaluará el efecto antioxidante y anticariogénico *in vitro* de las fracciones peptídicas bioactivas obtenidas de los hidrolizados de proteínas de dos variedades de frijol: frijol pinto y frijol flor de mayo.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Proteínas

Las proteínas son polímeros lineales formados por aminoácidos que se pliegan en el espacio en una gran variedad de formas tridimensionales; pueden construir complejos superiores e, incluso, hacerlo con otras macromoléculas para formar grandes complejos supramoleculares. Estas moléculas tienen una enorme variedad de funciones, tanto estructurales como funcionales; por lo tanto se pueden clasificar con base en diferentes parámetros: como su composición, propiedades físicas, forma espacial o función biológica (Arboledas, 2011). Las proteínas son componentes fundamentales de los alimentos que nutricionalmente proporcionan aminoácidos esenciales para el crecimiento y mantenimiento del cuerpo humano. Desde el punto de vista funcional, estos afectan las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de los alimentos, así como también, muchas proteínas de la dieta pueden ejercer efectos fisiológicos benéficos en el cuerpo humano (Korhonen et al., 1998).

En los procesos biológicos las proteínas son el centro de la acción; prácticamente todas las transformaciones moleculares que definen el metabolismo celular están mediadas por catalizadores proteicos. Una de las claves para descifrar la función de una proteína dada es comprender su estructura; sin embargo, estas macromoléculas no tienen estructuras uniformes y regulares, esto se debe, en parte, a que los 20 residuos de aminoácidos que las forman tienen propiedades químicas y físicas muy diferentes. La secuencia con la que se unen estos aminoácidos puede analizarse directamente, esta información nos da una idea de las propiedades físicas y químicas de las proteínas, sus relaciones con otras proteínas y, en última instancia, de sus mecanismos de acción en los organismos vivos (Voet et al., 2007).

Las proteínas se sintetizan in vivo mediante la polimerización paso a paso de los aminoácidos en el orden especificado por la secuencia de nucleótidos de un gen; las posibilidades teóricas de los polipéptidos son ilimitadas. Las características de una proteína

individual dependen más de su secuencia de aminoácidos que de su composición de aminoácidos en sí.

Las proteínas determinan las propiedades físicas y sensoriales de muchos alimentos, como por ejemplo, la consistencia y textura de la carne, leche, queso o pan, dependen en gran medida de la naturaleza de las proteínas que los constituyen, pero también, en alimentos elaborados con una presencia menor de proteínas pueden jugar un papel muy importante, influyendo en características funcionales, desde el punto de vista tecnológico, como la absorción de agua o aceite o la formación de emulsiones, geles y espumas (Vioque et al., 2000). Actualmente, existen cuatro formas de incluir aminoácidos en el torrente sanguíneo: en forma de aminoácidos libres, mediante hidrolizados proteínicos, como suplemento de proteínas intactas y/o la proteína entera de los alimentos. Así mismo, las proteínas pueden ser hidrolizadas produciendo cadenas pequeñas de aminoácidos llamados péptidos. Debido a que el consumo de proteínas intactas puede causar reacciones alérgicas a individuos sensibles y como una alternativa a este problema, pueden utilizarse hidrolizados proteínicos en la dieta porque estos conservan su valor nutricional y son más digeribles.

## **2.2 Proteínas de la dieta**

Las proteínas alimentarias son una fuente de energía y además son materiales ricos para la obtención de péptidos bioactivos, así como también son componentes esenciales en la nutrición humana, ya que forman parte de los alimentos y cumplen con funciones básicas tanto desde el punto de vista funcional como nutricional (Clemente et al., 1999). Nutricionalmente, proporcionan los aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas corporales y otras sustancias nitrogenadas esenciales para el crecimiento y mantenimiento del organismo. Funcionalmente, afectan las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de los alimentos, proporcionando atributos únicos debido a sus propiedades intrínsecas y/o a su interacción con otros componentes, fundamentalmente lípidos y carbohidratos e inclusive algunas proteínas y péptidos pueden ejercer efectos fisiológicos benéficos en el cuerpo humano, ya que poseen propiedades biológicas que hacen a estos componentes ingredientes potenciales por su bioactividad o como alimentos promotores de la salud. De igual forma,

estas proteínas pueden afectar la funcionalidad tecnológica de los productos finales proyectados, por lo que es un factor esencial para aplicar o desarrollar tecnologías para conservar o regular el aumento de componentes bioactivos en sistemas alimenticios (Korhonen et al., 1998).

Desde el punto de vista funcional existen numerosas investigaciones sobre el estudio de las proteínas alimentarias como componentes beneficiosos, en las cuales se estudia la generación de péptidos bioactivos a través de proteínas de diversos alimentos (Vioque & Millán, 2005). Sin embargo, desde los años ochenta ha existido una demanda de fuentes proteínicas vegetales para la elaboración de formulaciones alimentarias, sustituyendo a los hidrolizados de origen animal. Recientemente se ha encontrado que las proteínas de origen vegetal presentan un contenido elevado del mismo, el cual es importante para ser explotadas en la obtención de ciertos componentes bioactivos como son: péptidos, fracciones peptídicas y aminoácidos libres, que pueden tener determinada actividad benéfica al organismo (Clemente et al., 1999).

Los productos de proteína de planta han ganado interés como ingredientes en sistemas de alimentos en muchas partes a nivel mundial; el éxito final de utilizar proteínas de planta como aditivos depende enormemente de las características favorables que ellos imparten a productos de alimentación. En los países desarrollados, las proteínas de planta ahora son consideradas como ingredientes versátiles funcionales o como componentes biológicamente activos, más que como sustancias nutritivas y esenciales.

### **2.3 Leguminosas**

En la vida cotidiana se intercambian los vocablos “legumbres” y “leguminosas”; pero las leguminosas son, en realidad, un género botánico; plantas que dan semillas dentro de una vaina, y no espiga, como los cereales. Las leguminosas incluyen las lentejas, guisantes, judías, pero también la soya o los altramuces. A nivel mundial los principales productores de leguminosas son India, Francia, Estados Unidos y Canadá. En cuanto a su consumo, los

datos son muy variables, ya que la ingesta real por familia e individuos depende de muchos factores (climáticos, geográficos, socioeconómicos y estacionales).

Las leguminosas son buenas fuentes de carbohidratos: aportan de 13 a 15 g por 100 g (tras su cocción). Estos carbohidratos resultan convenientes, puesto que están constituidos por almidón, un carbohidrato complejo compuesto por cadenas de glucosa. Cuantitativamente, las proteínas presentan el nutriente más importante, después de los carbohidratos de las leguminosas; esto es lo que las diferencia de los cereales; la calidad de las proteínas, sea cual sea el alimento, depende de su contenido de aminoácidos, sin embargo, como todas las fuentes de proteínas vegetales, son deficientes en un aminoácido: la metionina. Es lo que limita su interés nutritivo y que hace que no puedan ser la única fuente de proteínas alimentaria. Entre las leguminosas, la soya tiene un perfil equilibrado, ya que es la menos deficiente en metionina, esta contribuye, combinada con otras leguminosas, a equilibrar el aporte nutritivo de estos últimos (Liégois, 2012).

Las semillas maduras de las leguminosas tienen cuatro componentes principales: la testa, cáscara, los cotiledones y el eje embrional o hipocotilo. En las células de los cotiledones se encuentran los órganos proteicos y los gránulos de almidón, que constituyen la estructura anatómica de reserva dentro de las semillas. La composición química de las legumbres varía ligeramente entre los distintos tipos de semillas, aunque, en general, se caracterizan por tener un alto contenido en proteínas e hidratos de carbono complejos (fibra dietética y almidón). Sin embargo, las ventajas nutricionales que presentan las legumbres frente a otros alimentos, como su alto contenido en proteínas y fibra dietética, se han aprovechado poco en las últimas décadas, debido al alto valor calórico que aportan las formas habituales de cocinado, digestión, producción de flatulencia y el mayor tiempo que necesitan de cocción (Gil & Ruíz, 2010).

La cantidad de proteínas de las leguminosas varía mucho según la especie, pero incluso las de menor contenido presentan, aproximadamente un contenido tres veces superior al arroz (6.67 g por cada 100 g). El contenido de proteína total oscila entre el 20 y 35% aunque hay variedades de semillas que pueden presentar un contenido superior; no obstante, este

método sobreestima el contenido de proteínas existentes en las leguminosas, al presentar estas semillas una alta proporción de nitrógeno no proteico que se cuantifica dentro de la proteína total. La tabla 1 nos muestra el contenido de proteína total y proteína verdadera de distintas leguminosas, donde se puede observar cómo el contenido de proteína verdadera es menor al de proteína total, destacando un porcentaje de nitrógeno no proteico (constituido por péptidos, aminoácidos libres y otros compuestos nitrogenados no proteicos, como derivados de purinas y pirimidinas), que se han de ser tomados en cuenta cuando se realizan estudios nutricionales.

Las proteínas de las leguminosas se clasifican como: proteínas de reserva o globulinas, que constituyen la mayor proporción y se encuentran en los órganos proteicos, y proteínas funcionales y estructurales, que son las albúminas y glutelinas. Casi todas las proteínas de las leguminosas contienen un 70% de globulina, un 10-20% de albúmina y un 10-20% de glutelina. Las leguminosas son la principal fuente de proteínas en la alimentación humana, ya que constituyen el único aporte de componentes nitrogenados en la dieta de los países en vías de desarrollo. Sin embargo, su valor nutricional es pobre, comparado con las proteínas de origen animal, debido a los siguientes factores:

- ش La proteína de las leguminosas es limitante en su contenido de aminoácidos esenciales azufrados (metionina y cisteína).
- ش La estructura cuaternaria de las proteínas es más compacta y dificulta la acción de las enzimas.
- ش La presencia de las proteasas que inhiben la actividad de las proteasas digestivas.

Todos estos factores determinan la menor digestibilidad de la proteína de las leguminosas en estudios *in vivo* e *in vitro*, con valores de digestibilidad significativamente inferiores a las proteínas de origen animal (Gil & Ruíz, 2010). Sin embargo, se ha mostrado una evolución hacia la salud y la funcionalidad con el reemplazo parcial de proteínas de origen animal, que principalmente conduce a productos de alimentación como leguminosas, que mejoran el estado alimenticio debido al nivel de colesterol inferior en productos de alimentación de planta, y el aumento en el nivel de ingesta de fibra que reduce el riesgo de

enfermedades intestinales, incluyendo el cáncer, así como también la reducción de la incidencia de osteoporosis (Sirtori & Lovati, 2001).

**Tabla 1.** Composición química proximal, contenido de minerales y vitaminas en distintos tipos de leguminosas.

| Componentes (%) | Judías | Frijoles | Lentejas | Garbanzo | Soya |
|-----------------|--------|----------|----------|----------|------|
| Fibra dietética | 18.4   | 16.6     | 10.6     | 10.7     | 20.9 |
| Proteínas       | 21.2   | 22.9     | 23.5     | 22.7     | 36.9 |
| Grasa           | 1.6    | 1.4      | 1.4      | 3        | 18.1 |
| Carbohidratos   | 47.8   | 56.7     | 50.8     | 54.6     | 6.1  |
| Minerales       | 4.0    | 2.7      | 3.2      | 3.0      | 4.7  |
| Agua            | 11.6   | 11.0     | 11.8     | 8        | 8.5  |

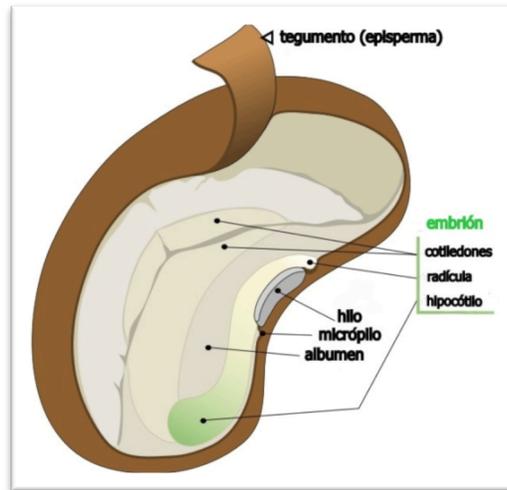
*Fuente:* Belitz y Grosh, 1997.

Los frijoles son ricos no sólo en proteínas, sino también en carbohidratos, grasas, minerales y otras sustancias nutritivas. Para que las proteínas de una planta puedan ser útiles en el uso de alimentos, deben poseer varias características deseables, como propiedades funcionales, así como el suministro de aminoácidos esenciales. Estas propiedades son características intrínsecas fisicoquímicas, que afectan el comportamiento de proteínas en sistemas de alimentos durante el tratamiento, la fabricación, el almacenaje y la preparación (Kinsella, 1976). La búsqueda de fuentes de proteínas en plantas ha estimulado el interés de la investigación al caracterizar y aislar proteínas de legumbres subutilizadas. Como se puede observar, los frijoles son la segunda mayor fuente de proteína en las leguminosas, después de la soya; la importancia de éstos en la alimentación es debida a que en nuestro país se consumen en gran medida, y se han llegado a nombrar como “la carne del hombre pobre” debido a su alto contenido de proteínas y bajo costo.

### 2.3.1 Frijoles

Los frijoles son las semillas de leguminosa más importantes para el consumo humano en el mundo; se componen de cotiledones, tegumento, radícula, hipocótilo, hilo, micrópilo y albúmen (Figura 1). El consumo promedio anual per cápita de frijol en México es de

aproximadamente 16 kg por año, el estado de Durango sobresale con un promedio de 18 kg por año, el intervalo según el estrato social varía entre 10 y 26 kg (Broughton, 2003); sin embargo, existen hábitos preferenciales en el consumo de frijol en México, las principales características que utilizan los consumidores para definir sus preferencias se basan en el tiempo de cocción, sabor, además del color, tamaño y brillantez.



*Figura 1. Partes de la semilla de frijol.*

En muchos países de América Latina, como en México, el maíz y el frijol son la principal fuente de proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales para la población (Guzmán-Maldonado et al., 2000). En la Tabla 2 se muestra la producción de frijol en México durante los años 2000 – 2014.

Dentro de las características importantes que destacan el valor nutritivo de las leguminosas en la nutrición humana es que presentan de 2 a 3 veces más proteína que los cereales; además de un alto contenido de minerales, especialmente Fe, Ca y Zn (Deshpande, 1992). En particular, se considera que el frijol es un alimento rico en macronutrientes como las proteínas y carbohidratos aunque escaso en grasa, además contiene vitaminas y micronutrientes que elevan aún más su valor nutricional. Las proteínas presentes en el frijol, juegan un papel esencial en la nutrición humana por complementación con otros alimentos como el maíz en América Latina y el este de África y el arroz en Brasil.

**Tabla 2.** Producción de frijol en México

| Año   | Superficie (Miles ha) |           | Volumen de producción (Miles ton) |
|-------|-----------------------|-----------|-----------------------------------|
|       | Sembrada              | Cosechada |                                   |
| 2000  | 2,120.7               | 1502.8    | 887.9                             |
| 2001  | 1952.5                | 1698.2    | 1062.6                            |
| 2002  | 2228.1                | 2054.4    | 1549.1                            |
| 2003  | 2040.4                | 1904.1    | 1414.9                            |
| 2004  | 1822.6                | 1678.4    | 1163.4                            |
| 2005  | 1746.0                | 1261.2    | 826.9                             |
| 2006  | 1809.7                | 1723.2    | 1385.8                            |
| 2007  | 1688.5                | 1489.2    | 994.0                             |
| 2008  | 1626.0                | 1503.2    | 1111.1                            |
| 2009  | 1676.7                | 1205.3    | 1041.3                            |
| 2010  | 1887.2                | 1630.2    | 1156.3                            |
| 2011  | 1506.0                | 895.0     | 567.8                             |
| 2012  | 1700.5                | 1559.0    | 1080.9                            |
| 2013p | 1831.9                | 1755.4    | 1294.0                            |
| 2014e | 1840.0                | 1754.1    | 1298.0                            |

*Fuente:* SIAP-SAGARPA. /p Cifras preliminares /e Cifras estimadas

Las de mayor importancia son las faseolinas (glicoproteína trimérica) porque son las mejores proteínas de las leguminosas para la nutrición humana y por ser las más abundantes, ya que conforman el 40% de la proteína total en la semilla (Sharma, 2006). Estas proteínas pueden ser observadas mediante la técnica de Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE por sus siglas en inglés), donde las bandas correspondientes a las subunidades de la faseolina (43-53 kDa) aparecen como las más intensas y de mayor tamaño en comparación con las demás. También se observan fitohemaglutininas (55-65 kDa), argelinas (31-40 kDa) e inhibidores de  $\alpha$ -amilasa (15-18 kDa) (Bernal et al., 2006).

En México existen cerca de 70 variedades de frijol que se distribuyen en 7 grupos de acuerdo a su color: negros, amarillos, blancos, morados, bayos, pintos y moteados. Se estima que en el Noroeste de México el 90% de los encuestados consume frijol dulce, en el Noreste el 70% consumen frijol pinto o bayo, en el Sur el 90% consume frijol negro y en el Centro se consumen todas las clases comerciales, sobresaliendo Flor de Mayo y Flor de

Junio (Castellanos et al., 1997). Las variedades menos consumidas son la alubia blanca, bayo blanco, negro Zacatecas, ojo de cabra y bayo berrendo (Muñoz-Saldaña, 2010).

### 2.3.1.1 Frijol flor de mayo

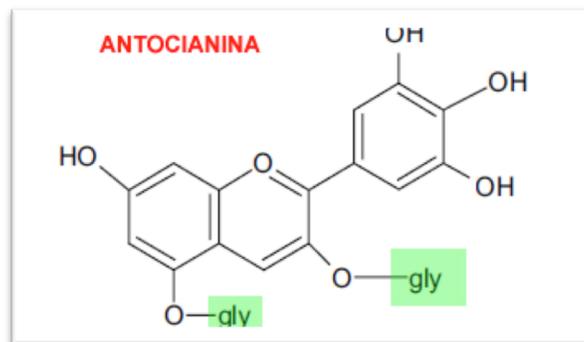
En el Centro de México, el frijol (*Phaseous vulgaris* L.) tipo Flor de Mayo (Figura 2) es uno de los tipos comerciales de mayor demanda; este tipo de frijol se introdujo hace más de 40 años con la variedad Flor de Mayo Criollo (FM Criollo), de ciclo largo y hábito indeterminado tipo III. Es una semilla de forma generalmente reniforme y más o menos plana, el pericarpio es liso, de color negro uniforme, opaco, brillante o semibrillante, su hilio es de color blanco, de 1 - 2 cm de longitud y de 0.5 - 1 cm de grosor; de acuerdo a la variedad en ocasiones la semilla es más redonda. Existe una gran variedad de éstos frijoles.



**Figura 2.** Granos de frijol Flor de Mayo

En 100 g contiene 55.4 g de carbohidratos, 21.8 g de proteína, 2.5 g de lípidos, 4 g de fibra cruda en forma de celulosa y hemicelulosa, calcio 183 mg, 352 mg de fósforo, pequeñas cantidades de tiamina, riboflavina y niacina, 4.70 mg de hierro de baja disponibilidad, el contenido proteico y de aminoácidos esenciales (lisina y metionina) se debe a su capacidad de asociarse con bacterias del género *Rhizobium* que fijan el nitrógeno atmosférico convirtiéndolo en amoníaco disponible para ser absorbido.

Por su contenido de sustancias tóxicas inhibidoras de la tripsina que disminuyen la utilización de proteínas y sus carbohidratos no biotransformables que pueden favorecer meteorismo o flatulencia, se recomienda consumirlo bien cocido, con un remojo previo de 12 a 24 h debiendo desecharse el agua de su remojo, con lo cual se elimina parte de estas sustancias y se modifica la fibra cruda. Los fitatos pueden inhibir la absorción de hierro. Por su alto contenido en fibra puede inhibir la absorción de calcio y evitar la prevención del desarrollo de osteoporosis. Por su alto contenido en aminoácidos aromáticos, deben evitarse en el daño hepático crónico para evitar la encefalopatía. Por su contenido en fibra no se recomienda en infarto reciente (IMSS, 2014). Contiene ácido fólico y aminoácidos por lo que es útil en embarazadas y en etapas de crecimiento; debido a su alto contenido proteico y de aminoácidos es fuente de proteínas de origen vegetal. Por su contenido energético y proteico no se recomienda en enfermedades hipermetabólicas; así mismo tiene una actividad antioxidante debido a la presencia de antocianinas (flavonoides) (Figura 3), las cuales son pigmentos que también influyen en el color.

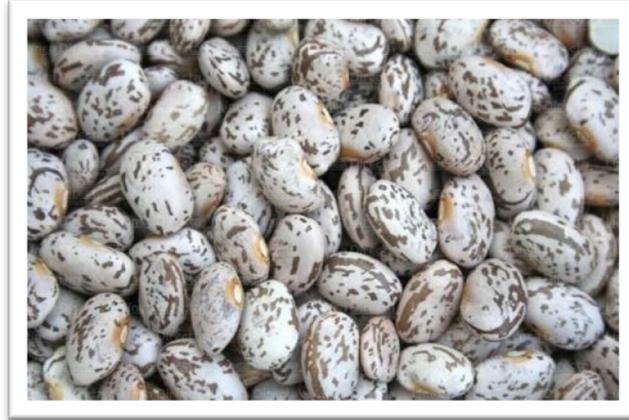


*Figura 3. Molécula de antocianina o flavonoide.*

### 2.3.1.2 Frijol pinto

Es la semilla seca que se encuentra dentro de la vaina, se extrae hasta que está madura y seca, de forma generalmente reniforme y más o menos plana, el pericarpio es liso, brillante, de color poco definido, jaspeado, con colores beige, rosa y lila, el hilio está delimitado por

una franja lila oscura, de 1 - 1.5 cm de longitud y de 0.7 a 1 cm de grosor de acuerdo a la variedad (Figura 4).



*Figura 4. Granos de frijol pinto.*

Esta variedad de frijol, en 100 g contiene 58.6 g de carbohidratos, 20.3 g de proteína, 2.8 g de lípidos, 4.3 g de fibra cruda en forma de celulosa y hemicelulosa, calcio 132 mg, 247 mg de fósforo y pequeñas cantidades de tiamina, riboflavina, niacina y hierro (6.7 mg) de baja disponibilidad. Contiene carbohidratos no biotransformables (rafinosa, estaquiosa, verbascosa y arabinosa), por las lectinas, fitatos y taninos que son sustancias parcialmente termolábiles, debe desecharse el agua de su remojo y consumirse bien cocidos. Contiene ácido fólico, Cobre, Zinc, Magnesio, Fósforo y Potasio, es fuente de ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados siendo éste último en esta variedad de menor cantidad (IMSS, 2014).

#### **2.4 Hidrólisis proteínica**

La esencia de la hidrólisis proteínica es la ruptura del enlace peptídico y en consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres. La ruptura de estos enlaces puede producirse por métodos químicos (con ácidos o bases), biológicos (con enzimas) o por fermentación (con el uso de bacterias ácido lácticas). Aunque la modificación química es rápida y de bajo costo, la modificación enzimática es preferible ya que la reacción de la enzima requiere condiciones suaves y tiene mínimos efectos sobre la

calidad nutricional de la proteína. También las enzimas tienen una acción específica, la cual permite al procesador de alimentos tener más control en la determinación de la funcionalidad del producto final (Were et al., 1997). En la industria de los alimentos a menudo la hidrólisis enzimática es aplicada para obtener proteínas alimentarias con mejores propiedades funcionales sin la pérdida de su calidad nutritiva. Sin embargo, la reacción tiene que ser monitoreada continuamente, debido a que una hidrólisis prolongada de las proteínas puede conducir a la generación de péptidos amargos, el cual es un factor no deseable para la elaboración de un producto específico y para el consumidor final. Los péptidos obtenidos mediante la hidrólisis proteica pueden presentar cierta actividad funcional para el organismo, dependiendo de la composición y secuencia de aminoácidos, estos son conocidos como “péptidos bioactivos”.

#### **2.4.1 Péptidos bioactivos**

Estructuralmente, los péptidos son pequeños polímeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Uno o más polipéptidos constituye una molécula de proteína. Las proteínas son componentes esenciales de los tejidos en el organismo y participan en un gran número de procesos fisiológicos dentro de las células. En los alimentos, las proteínas son un importante macronutriente, sirviendo como fuente de energía y aminoácidos, que son esenciales para el correcto funcionamiento y mantenimiento de cuerpo. Las proteínas son responsables de varias propiedades fisicoquímicas y sensoriales de los alimentos, por lo que pueden actuar como ingredientes funcionales y promotores de la salud. Muchas de las propiedades funcionales y fisicoquímicas de las proteínas son atribuidas a péptidos biológicamente activos encriptados en las moléculas de proteína. En la Tabla 3 se muestran las técnicas que se usan con mayor regularidad para la purificación e identificación de diversos péptidos bioactivos. Los péptidos bioactivos generalmente contienen 3-20 residuos de aminoácidos (Pihlanto-Leppälä, 2000), pero en algunos casos este intervalo puede extenderse. Los péptidos biológicamente activos, una vez liberados como entidades independientes, actúan como moduladores potenciales del metabolismo y compuestos reguladores con actividades similares a hormonales (Korhonen & Pihlanto, 2003).

En años recientes la Ciencia de los Alimentos y Nutrición se ha interesado en los péptidos biológicamente activos presentes en las proteínas de los alimentos. Tales péptidos son inactivos dentro de la proteína precursora y pueden ser liberados por proteólisis enzimática durante la digestión gastrointestinal, durante el procesado de alimentos o mediante hidrólisis química o enzimática (Mulero-Cánovas et al., 2011). Los hidrolizados proteínicos se pueden elaborar mediante procesos químicos, ya sea con ácidos o álcalis, o mediante procesos biológicos empleando enzimas. El método enzimático es el más recomendado si los productos serán utilizados en el campo de los alimentos (Vioque et al., 2001). Son secuencias aminoacídicas que tienen la capacidad de regular diversos procesos fisiológicos, ayudando a prevenir y/o tratar diferentes desordenes en la salud, que favorecen al estado de bienestar de los humanos (Hernández-Ledesma et al., 2013; Segura-Campos et al., 2013a).

**Tabla 3.** Técnicas mayormente usadas para purificación e identificación de péptidos bioactivos.

| Purificación                                     | Identificación/detección   |
|--|--|
| Técnicas basadas en membranas                    | Técnicas espectrofotométricas  |
| Microfiltración (MF)                             | Detección ultravioleta (UV)  |
| Ultrafiltración (UF)                             | Detección de fluorescencia (FL)  |
| Nanofiltración (NF)                              |  |
| Ósmosis reversa (RO)                             | Detección de la dispersión de luz evaporada (ELSD)                               |
| Técnicas cromatográficas                         | Técnicas de espectrometría masas   |
| Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) | Ionización triple cuádruple de presión atmosférica (API-III)                     |
| Cromatografía de intercambio de ión (IEC)        | Ionización de electrospray (ESI-MS/MS)   |
| Electroforesis capilar (CE)                      |  |
| Separación con enfoque capilar isoelectrico      | Desorción de láser con matriz asistida de ionización-tiempo-de-vuelo (MALDI-TOF) |
|  | Otros espectrómetros de masas  |
| Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)       |  |
| Cromatografía contracorriente (CCC)              |  |
| Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)   |  |
| Cromatografía de afinidad (AC)                   |  |

Fuente: AOAC, 2008.

La función de los péptidos bioactivos está basada en su composición aminoacídica y su secuencia, además algunos péptidos pueden poseer propiedades multifuncionales (Korhonen & Pihlanto, 2006).

En los últimos años, debido a la gran relevancia que estos péptidos han obtenido en el mercado, se han desarrollado técnicas para la obtención de nuevos péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias mediante digestión enzimática *in vitro*, empleando enzimas proteolíticas de origen microbiano, animal y vegetal, así como a través de la hidrólisis por microorganismos proteolíticos (Korhonen & Pihlanto, 2006). En la industria de los alimentos, a menudo la hidrólisis enzimática es aplicada para obtener proteínas alimentarias con mejores propiedades funcionales sin la pérdida de su calidad nutritiva, ya que la reacción de la enzima requiere condiciones suaves y tiene mínimos efectos sobre la calidad nutricional de la proteína (Van der Plancken et al., 2003). El término bioactivo se emplea para describir componentes con diversos tipos de actividad biológica, tales como funciones antihipertensivos, opioides, antioxidantes, anticolesterolémicos, antimicrobianos, anticariogénicos, antitrombóticos, anticancerígenos e inmunomoduladores (Vioque et al., 2000).

#### **2.4.1.1 Obtención de péptidos mediante hidrólisis enzimática**

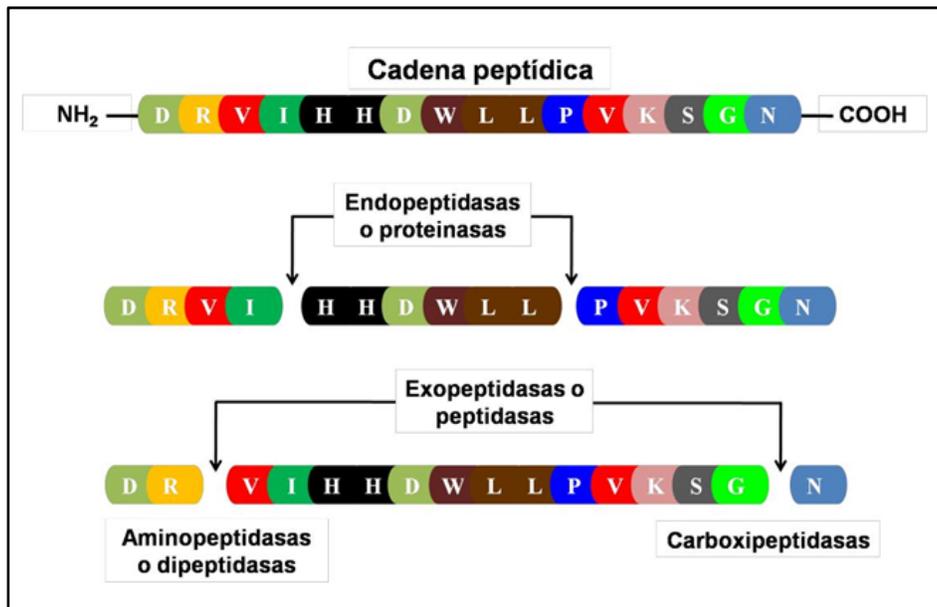
La hidrólisis de proteínas en los alimentos se lleva a cabo buscando el mejoramiento de las características nutrimentales, el retardo del deterioro, el aumento de la solubilidad, el incremento de la formación de espuma, de las propiedades de coagulación y de la capacidad emulsificante, así como la remoción de sabores y olores desagradables y de sustancias tóxicas o inhibitorias (Lahl & Braun, 1994). En la hidrólisis de proteínas, la escisión de los enlaces peptídicos puede ser llevado a cabo por procesos enzimáticos o químicos. Los procesos químicos que incluyen la hidrólisis ácida o alcalina, tienden a ser difíciles de controlar, y el producto sufre una alta modificación de aminoácidos. Las condiciones de hidrólisis ácida convencional para la determinación de aminoácidos, usa HCl 6 M a 110 °C por más de 24 h, puede destruir al aminoácido triptófano, mientras que la hidrólisis alcalina puede reducir el contenido de los aminoácidos cisteína, arginina,

treonina, isoleucina, serina y lisina. Por otra parte la hidrólisis enzimática requiere de condiciones no agresivas, evitando así las condiciones extremas para los tratamientos químicos, además de que no se disminuye el valor nutricional de la proteína (Tavano, 2013).

En la hidrólisis enzimática de proteínas hasta péptidos o aminoácidos, por acción de enzimas proteolíticas, la composición final y, por tanto, el uso de los hidrolizados dependerá principalmente de la fuente proteica, del tipo de proteasa usada, de las condiciones de hidrólisis y del grado de hidrólisis alcanzado en la reacción (Benítez et al., 2008). Las proteasas o enzimas proteolíticas hidrolizan los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad, lo cual permite desarrollar hidrolizados proteínicos con características químicas y nutricionales bien definidas (Badui, 2006; Tavano, 2013). Generalmente, las proteasas que se utilizan son mezclas enzimáticas de grado comercial, se venden en estado líquido o sólido y se clasifican de varias formas. Según su origen pueden ser de animales, vegetales, o microorganismos (bacterias y hongos) (Guadix et al., 2000). Durante la hidrólisis, la fuente de proteína, el tipo de enzima, la actividad biológica y las condiciones del proceso influyen en la composición de péptidos en el hidrolizado y por lo tanto en sus propiedades funcionales (Van der Ven et al., 2002; Mulero-Cánovas et al., 2011).

La especificidad de una proteasa determina la posición en la cual una enzima cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos. El sitio activo de una enzima tiene un arreglo característico de residuos de aminoácidos los cuales definen la interacción enzima-sustrato. El conocimiento de la especificidad de una proteasa provee información que lleva a una mejor elección para actuar sobre un sustrato específico. La diferencia de especificidad entre proteasas es importante para considerar que proteasa elegir, de acuerdo a la fuente de proteína que será hidrolizada, así como predecir los productos que se obtendrán. Una misma proteína puede producir diferentes hidrolizados usando diferentes proteasas (Tavano, 2013). Estas proteasas pueden ser clasificadas, por su origen, (animal, vegetal, bacteriano o fúngico), por su modo de acción catalítica (endo- o exo-actividad) o con base en su sitio catalítico (Benítez et al., 2008).

Con base en su actividad catalítica, las proteasas pueden dividirse en dos grandes grupos: endopéptidasas o proteinasas, si hidrolizan enlaces internos de las cadenas peptídicas y exopéptidasas o péptidasas si hidrolizan aminoácidos y dipéptidos de los extremos de las cadenas polipeptídicas (Guadix et al., 2000). Estas últimas pueden dividirse a su vez en aminopeptidasas si actúan por el extremo N-terminal o carboxipeptidasas si lo hacen por el extremo C-terminal (Figura 5) (Vioque et al., 2001).



**Figura 5.** Clasificación de enzimas según su actividad catalítica. (Torruco-Uco et al., 2008)

Por otra parte, el grado de hidrólisis es la propiedad fundamental de un hidrolizado y va a determinar en gran medida las restantes características del mismo y por tanto su posible uso. El grado de hidrólisis se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original. El grado de hidrólisis final está determinado por las condiciones utilizadas, siendo éstas, la concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato, el tiempo de incubación y las condiciones fisicoquímicas tales como el pH y la temperatura. Otro factor que también va a determinar el grado de hidrólisis es la naturaleza de la enzima, caracterizada por su actividad específica y tipo de actividad. Así, la naturaleza de la enzima usada no sólo va a influir en el grado de hidrólisis, sino también

en el tipo de péptidos producidos (Benítez et al., 2008). Dependiendo del grado de hidrólisis (GH), los productos proteínicos pueden ser clasificados en hidrolizados parciales (GH < 10%) y extensivos (GH > 10%), cada uno de ellos presenta propiedades específicas que afectan a su utilización siendo los hidrolizados extensivos una tendencia prometedora en el campo de los alimentos funcionales, debido a la presencia de péptidos con actividad biológica, los cuales pueden actuar sobre diversos procesos fisiológicos del organismo (Vioque et al., 2006). Actualmente se encuentran disponibles comercialmente muchas proteasas grado-alimenticio (Tabla 4).

**Tabla 4.** Principales enzimas comerciales utilizadas en la obtención de péptidos con diferentes actividades biológicas.

| Tipo de enzima             | Fuente                            | Nombre             | Temp. (°C) | Intervalo de pH | Sitio de acción catalítica |
|----------------------------|-----------------------------------|--------------------|------------|-----------------|----------------------------|
| <b>Serinproteasas</b>      |                                   |                    |            |                 |                            |
| Animal                     | (Porcino, bovino)                 | Tripsina           | 30-60      | 7-9             | -*Lis (o Arg) ---          |
|                            |                                   | Quimotripsina      | 45-55      | 8-9             | -*Trp (o Tir, Fe, Leu) --- |
|                            |                                   | Elastasa           |            | 6-8             | -*Ala----                  |
| Bacteriana                 | <i>Bacillus</i>                   | Substilisín.       |            |                 |                            |
|                            | <i>licheniformis</i>              | Carlsberg,         | 50-60      | 6-10            |                            |
|                            |                                   | Alcalasa           |            |                 | -*AAhf----                 |
|                            | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | Subst. BPN,        | 40-55      | 6-10            |                            |
|                            |                                   | Substilisín Novo   |            |                 |                            |
| <b>Cisteinproteasas</b>    |                                   |                    |            |                 |                            |
| Plantas                    | Papaya                            | Papaína            | 40-75      | 5-8             | -*Fe (o Val, Leu)-         |
|                            | Piña                              | Bromelaina         | 20-65      | 5-8             | AAhf ---                   |
|                            | Látex de Ficus                    | Ficina             |            | 5-8             |                            |
| <b>Aspartato proteasas</b> |                                   |                    |            |                 |                            |
| Animal                     | Porcino, bovino                   | Pepsina            |            | 1-4             | -Fe (o Tir, Leu)*-Trp      |
|                            | Becerro                           | Quimosina          |            | 4-6             | (o Fe, Tir)                |
| Fúngica                    | <i>Aspergillus saitoi</i>         | Aspergilopeptidasa | 35-50      | 2-5             | Glu, Asp, Leu *---         |
|                            |                                   | A                  |            |                 |                            |
|                            | <i>Rhizopus sp.</i>               | Newlasa            | 40-50      | 3-6             | Similar a la pepsina       |
| <b>Metallo</b>             |                                   |                    |            |                 |                            |

| <b>proteasas</b>   |                             | Carboxipeptidasa                |       |       | *Carbonilo del AA terminal del péptido, excepto Pro, Arg, Lis |
|--|-----------------------------|---------------------------------|-------|-------|---|
| Animal   | Páncreas                    | A                               |       | 7-8   |   |
|  | <i>Bacillus</i>             |                                 |       |       |   |
| Bacteriana   | <i>amyloliquefaciens</i>    | Neutrasa®                       | 40-55 | 6-7,5 | -Fe, Leu, Val*---   |
|  | <i>Bacillus</i>             | Termolisina                     |       | 7-9   | -Ile, Leu, Val, Fe*--   |
|  | <i>thermoproteolyticus</i>  |                                 |       |       |   |
| <b>Preparaciones enzimáticas</b>                                   |                             |                                 |       |       |   |
| Mezcla de papaína, quimopapaína y lisozima                         | Fruto de la papaya          | Papaína cruda                   |       | 5-9   | Amplia especificidad  |
| Mezcla de tripsina, quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasa    | Páncreas (bovino y porcino) | Pancreatina                     | 30-80 | 7-9   | Muy amplia especificidad                                      |
| Mezcla de serin-, aspartato y metalo-proteasas.                    | <i>Aspergillus oryzae</i>   | Veron P, Sumicina LP, Biocina A | 40-55 | 4-8   | Muy amplia especificidad                                      |
| Mezcla de endo- y exoproteasas, actividad en pH alcalino y neutro. | <i>Streptomyces griseus</i> | Pronasa                         |       | 7-9   | Muy amplia especificidad                                      |

Fuente: Benítez et al. (2008).

#### 2.4.2 Actividad biológica de los péptidos

Los péptidos bioactivos o péptidos con actividad biológica producidos durante la digestión gastrointestinal o la elaboración de alimentos pueden ejercer un importante papel en la regulación y la modulación metabólica, que sugiere su uso potencial como nutraceuticos e ingredientes de alimentos funcionales para promoción de la salud y la reducción del riesgo de enfermedad (Mulero-Cánovas et al., 2011). Las secuencias aminoacídicas de los

péptidos tienen la capacidad de regular diversos procesos fisiológicos (Tabla 5), alterando el metabolismo celular y actuando como hormonas o neurotransmisores a través de interacciones hormona-receptor y cascadas de señalización; también pueden ejercer su acción sobre la regulación del metabolismo controlando las glándulas de excreción, ajustando la presión arterial, ejerciendo efectos sobre el sueño, memoria, dolor, apetito y los efectos de las vías de estrés del sistema nervioso central, ejerciendo sus efectos a nivel local o en diversos órganos una vez que han ingresado en el sistema circulatorio (Ruiz-Ruiz et al., 2013a).

**Tabla 5.** Péptidos biológicamente activos y sus efectos en el organismo.

| Péptidos  | Efecto en el organismo                                     |
|---|--|
| Inmunomoduladores                                       | Estimulan la respuesta inmune                              |
| Inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina-I | Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares |
| Antioxidantes   | Previenen enfermedades degenerativas y envejecimiento      |
| Reguladores del tránsito intestinal                     | Mejoran la digestión y absorción                           |
| Reguladores de la proliferación intestinal              | Reducen la proliferación de tumores cancerígenos           |
| Antimicrobianos   | Reducen el riesgo de infecciones                           |
| Anticoagulantes   | Reducen los riesgos de padecer trombos                     |

*Fuente:* Iwaniak & Minkiewicz (2007).

Considerando la relación que guarda la nutrición con el estado de salud, los péptidos con actividad biológica podrían ayudar a reducir la actual problemática de enfermedades crónicas degenerativas que afectan a un amplio sector de la población mundial (WHO, 1999).

#### 2.4.1.1 Actividad antioxidante

Un antioxidante puede definirse como una sustancia que disminuye las concentraciones, retrasa o previene la oxidación de un sustrato de manera significativa (Hernández, 2003). Los antioxidantes actúan a distintos niveles: pueden disminuir las concentraciones de oxígeno en compartimentos localizados, prevenir el inicio de la reacción en cadena de especies de oxígeno reactivo (EOR), descomponer a los peróxidos y convertirlos en alcoholes e interrumpir la reacción en cadena al interceptar radicales hidroxilo o alcoxilo (Aruoma, 1996).

Existen muchas evidencias de que la oxidación de moléculas biológicas, membranas y tejidos, inducida por el oxígeno activo y mediada por radicales libres, se relaciona con un aumento en la incidencia de las principales enfermedades digestivas de los seres humanos. Por otro lado, también se ha acumulado abundante información sobre la capacidad de algunos componentes de los alimentos para disminuir o prevenir los procesos de oxidación celular (Murillo, 2006). Estudios epidemiológicos indican que las dietas ricas en frutas, vegetales y granos están asociadas con disminución de riesgo de varias enfermedades degenerativas tales como el cáncer y enfermedades cardiovasculares. Esta asociación es a menudo atribuida a diferentes componentes antioxidantes tales como la vitamina C, vitamina E, carotenoides, licopenos, polifenoles y otros fitoquímicos (Amin et al., 2006). Murillo (2006) menciona que el metabolismo oxidativo, proceso biológico normal, es capaz de generar radicales libres oxigenados, altamente reactivos. Esas especies con oxígenos activos incluyen el radical superóxido ( $O_2$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical óxido nítrico (NO). Cabe mencionar, que permanentemente estamos expuestos a radiaciones electromagnéticas que rompen el agua generando radicales OH. Por lo que especies de oxígeno reactivo y otros radicales libres producen daño oxidativo en el DNA, proteínas y otras macromoléculas tales como los lípidos (Dávalos et al., 2004).

Proteínas, hidrolizados de proteínas, péptidos individuales y aminoácidos han mostrado un significativo poder antioxidante. Algunos aminoácidos han sido encontrados por poseer una actividad antioxidante fuerte en ácido linoleico y sistemas linoleato de metilo. Las proteínas

de una variedad de plantas, animales y fuentes microbianas, como el gluten, albúmina de huevo, caseína, proteína de soya y proteína de levadura han exhibido actividad antioxidante. En muchos casos, las fracciones peptídicas o los hidrolizados de proteínas han mostrado una mayor actividad antioxidante que las proteínas intactas o mezclas de aminoácidos, sugiriendo que los péptidos juegan un mayor papel en la actividad antioxidante de las proteínas.

Chen et al. (1996) identificaron 6 péptidos antioxidantes de la digestión proteolítica de la proteína de soya y encontraron que los péptidos están compuestos por 5-16 residuos de aminoácidos con aminoácidos hidrofóbicos V o L en la posición N-terminal, y P, H o Y en la secuencia. Proteínas de muchos recursos naturales y productos industriales han sido explorados para la producción de hidrolizados de proteínas con potencial antioxidante (Tabla 6).

**Tabla 6.** Actividades antioxidantes mostradas de diferentes hidrolizados de proteínas.

| <b>Péptidos</b>                                  | <b>Actividad antioxidante</b>   |
|--|---|
| Péptidos de soya                                 | Inhibición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)<br>Inhibición de oxidación de liposomas          |
| Hidrolizado de proteína de suero                 | Actividad secuestradora de radicales  |
| Derivados de péptidos de $\beta$ -lactoglobulina | Actividad secuestradora de radicales<br>Inhibición frente a la oxidación de lípidos en emulsiones de aceite en agua |
| Hidrolizado de caseína                           | Actividad secuestradora de radicales  |
| Caseinofosfófenoles                              | Actividad secuestradora de radicales<br>Inhibición de oxidación liposómica  |
| Hidrolizado de proteína de yema de huevo         | Actividad secuestradora de radicales<br>Inhibición de TBARS   |
| Hidrolizado de colágeno de piel de cerdo         | Actividad secuestradora de radicales  |
| Hidrolizados de proteína de capelán              | Inhibición de oxidación de caroteno-linoleato<br>Efectos sinérgicos con BHA, BHT y TBHQ                             |
| Hidrolizados de proteína de foca                 | Inhibición de oxidación de caroteno-linoleato   |
| Hidrolizados de proteína de                      | Actividad secuestradora de radicales  |

canola

Fuente: Shahidi, Zhong. (2008).

En adición a las proteínas de origen animal, las proteínas de origen vegetal son de mayor interés por proveer péptidos con potencial antioxidante. Los hidrolizados de soya nativa o pretratada son antioxidantes efectivos. Los hidrolizados de gluten de trigo y de proteínas de germen han mostrado una buena actividad antioxidante comparable con la de  $\alpha$ -tocoferol (Wang et al., 2007). Otros hidrolizados de proteína derivados de planta con propiedades antioxidantes incluyen a la canola, maíz, papa, cacahuete, girasol y *B. carinata* (Pedroche et al., 2007).

Otra fuente vegetal rica en péptidos con actividad antioxidante es el gluten de trigo, ya que su composición de aminoácidos es única, debido a que, cuenta con la presencia de E/Q y P en más del 50% de los residuos de aminoácidos total y cerca del 30% de estos aminoácidos presentan características hidrofóbicas y estos contribuyen grandemente a su habilidad para formar agregados proteínicos por interacciones hidrofóbicas, enlazando sustancias no polares, y su afinidad por el aceite, pueden tener efecto sobre la degradación de ácidos grasos. Debido a lo anterior, Suetsuna et al., (2002) aislaron del gluten de trigo péptidos con actividad antioxidante, mediante hidrólisis con pepsina, los cuales fueron fraccionados usando cromatografía de intercambio iónico y posteriormente purificadas con HPLC en fase reserva y la secuencia de aminoácidos fue determinada con un secuenciador de proteínas presentando las siguientes estructuras: AQIPQQ y LQPGQGQQG, por lo que, la presencia de residuos de Q y P dentro de su secuencia pueden presentar actividad antioxidante y estas secuencias corresponden a la estructura primaria de las gliadinas o glutenina.

#### **2.4.1.2 Actividad anticariogénica**

La caries dental involucra la desmineralización (solubilización del calcio y fósforo) del esmalte de los dientes, el cual consiste principalmente de fosfato de calcio cristalino incrustado dentro de una matriz proteínica (Warner et al., 2001). Diversos métodos han sido propuestos para minimizar la caries dental, siendo el más evidente la eliminación de las

causas de formación de ácidos a través de una reducción en la ingesta de alimentos ácidos y dulces (Reynolds, 1999). Otra propuesta está basada sobre la formación de una barrera física por la adsorción de algunos de los péptidos bioactivos sobre la superficie del diente para proporcionar protección contra la acción directa de los ácidos (Warner et al., 2001).

Los péptidos bioactivos con actividad anticariogénica tienen funciones múltiples para prevenir las lesiones dentales incluyendo la inhibición bacteriana, la exclusión competitiva de los sitios de unión del esmalte, la mejora de la capacidad de tamponamiento en los dientes circundantes de la película, la reducción de la desmineralización del esmalte y la remineralización del esmalte (Aimutis, 2004).

La principal fuente de extracción de los péptidos bioactivos con actividad anticariogénica han sido aislados principalmente de la hidrólisis proteolítica de las principales fracciones proteínicas de la leche, tal como la caseína. Diversos estudios han reconocido que los productos lácteos (caseína, leche, quesos) exhiben actividad anticaries. La prevención de la caries dental por péptidos bioactivos derivados de la leche es un complejo físico y químico de secuencias de eventos en forma de cascada. En general, los péptidos bioactivos con actividad anticariogénica tienen múltiples funciones en la prevención de las lesiones dentales, las cuales incluyen la inhibición bacteriana, la exclusión competitiva de los sitios de enlaces del esmalte, mejoran la capacidad amortiguadora en las películas que rodean al diente, reduce la desmineralización del esmalte y ayuda en la remineralización del esmalte (Aimutis, 2004). Muchos estudios se han realizado mediante el uso del complejo caseinofosfopéptidos-fosfato de calcio amorfo coloidal de los cuales han influido en los procesos de desmineralización y remineralización del esmalte dental (Reynolds, 1995).

### III. ANTECEDENTES

Actualmente se han realizado investigaciones sobre la utilización de péptidos con diversas actividades biológicas obtenidos mediante hidrólisis enzimática con el fin de solucionar los problemas de salud en la población.

**Warner et al. (2001)** llevaron a cabo un estudio con el objeto de evaluar el efecto protector *in vitro* de la caseína y fracciones peptídicas (péptidos) del suero de la leche, para ello utilizaron una suspensión de hidroxiapatita (HA) en buffer Tris-Hcl 0.1 M a pH 7 como reemplazo del esmalte dental y el buffer de acetato de sodio (NaAc) 0.4 M a pH 4.2 fue usado para representar los ácidos que se encuentran en la boca. Para la preparación de dos muestras se utilizó leche descremada (queso cottage del suero y suero ácido), mientras que el caseinato de sodio se utilizó para formar la fracción de caseinofosfopéptidos (CFP), los resultados mostraron que la fracción de CFP disminuyó la desmineralización de Ca y PO<sub>4</sub> en 0.88 y 0.06 µM respectivamente, comparado con la muestra control que fue de 4.45 y 0.33 µM. Por lo que, estos investigadores concluyeron que las fracciones de CFP pueden ser usados como agentes anticariogénicos.

**Peña-Ramos & Xiong (2002)**, hicieron preparaciones de aislados proteínicos de soya en estado nativo y precalentados, los cuales fueron hidrolizados con tres proteasas purificadas (pepsina, papaína y quimotripsina) y tres proteasas crudas (Alcalase®, Protamex™ y Flavourzyme™) y para ello emplearon un sistema de oxidación liposomal para medir la actividad antioxidante mediante la determinación de la concentración de TBARS (28 a 65%) con excepción de las muestras que fueron hidrolizadas con papaína. Las muestras precalentadas hidrolizadas con quimotripsina y flavourzyme durante 0.5 h tuvieron el mayor efecto inhibitorio sobre la oxidación de lípidos.

**Cai et al. (2003)**, evaluaron la remineralización de las lesiones de la superficie inferior del esmalte *in situ* mediante el uso de una tableta libre en azúcar, conteniendo caseinofosfopéptidos y fosfato de calcio amorfo, para ello utilizaron 10 individuos sanos (6 hombres y 4 mujeres, con una edad promedio de 34 ± 6.6 años, a los individuos se les

extrajo el tercer molar y estos fueron almacenados en una solución de acetato de formalina al 18% durante dos semanas, posteriormente fueron lavados tres veces con agua destilada y almacenados con etanol al 70%, a continuación los molares fueron pulidos sobre la superficie exterior con Soflex™ (3 M) para provocar las lesiones en la superficie inferior del esmalte de los molares. Se utilizaron cuatro tratamientos, los cuales consistieron en: tabletas sin azúcar de un peso de 1.75 g donde cada uno contenía 1) 18.8 mg de CFP-FCA; 2) 56.4 mg de CFP-FCA; 3) una tableta sin CFP-FCA y 4) tratamiento sin tableta (control), los resultados obtenidos fueron que las tabletas que contenían 18.8 y 56.4 mg de CFP incrementaron la remineralización de las lesiones de la superficie inferior del esmalte dental en un 78 y 16% respectivamente.

**Ruíz-Ruíz et al. (2005)**, evaluaron la actividad antioxidante de fracciones peptídicas de hidrolizados proteínicos de frijol endurecido con el fin de prevenir enfermedades degenerativas; debido a que la modificación vía hidrólisis enzimática de aislados proteínicos de frijol endurecido podría generar péptidos con actividad biológica. Se analizaron cuatro fracciones con tiempos de retención de: 1) 0 – 6 min; 2) 6 – 10 min; 3) 10 – 13 min y 4) 13 – 20 min. Los valores de capacidad antioxidante equivalente de trolox (TEAC) de las fracciones peptídicas obtenidas por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP) fueron: 1) 2301.4 mM/mg de proteína, 2) 1480.7 mM/mg de proteína, 3) 900.4 mM/mg de proteína y 4) 1238.7 mM/mg de proteína. Se concluyó que las fracciones peptídicas obtenidas del hidrolizado de frijol endurecido se plantean como fuentes naturales de péptidos antioxidantes, con potencial uso nutracéutico en sistemas alimentarios funcionales.

**Zhang et al. (2008)**, evaluaron la actividad antioxidante de péptidos y fracciones peptídicas obtenidos por extracción enzimática acuosa a partir de semillas de colza (*Brassica napus*). La extracción de los péptidos (CRPs) y sus fracciones (RP25 y RP55) fue realizada con pectinasa, celulasa, beta-glucanasa y alcalasa y tuvieron un peso molecular  $\leq 600$  Da. Los resultados obtenidos indicaron que RP55 y CRPs mostraron mayor poder reductor del radical DPPH que RP25 con un ED<sub>50</sub> 72, 41 y 499  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Estos autores concluyeron que las proteínas y péptidos de *Brassica napus* pueden ser usados para mejorar

la calidad nutricional de los alimentos, además de que la actividad antioxidante es una nueva característica funcional que presentan los péptidos de la semilla de colza, expandiendo sus aplicaciones como ingredientes para el desarrollo de alimentos funcionales.

**Córdova et al. (2013)**, determinaron la actividad anticariogénica de hidrolizados enzimáticos de concentrado proteínico de *Phaseolus lunatus*, empleando pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma-Aldrich, P7000). Estos autores obtuvieron un grado de hidrólisis (GH) de 12.4% (hidrolizado extensivo). El hidrolizado redujo la desmineralización del calcio y del fósforo presentes en una matriz de hidroxiapatita en 50.0 y 55.8%, respectivamente. Se concluyó que los hidrolizados proteínicos de *Phaseolus lunatus*, podrían ser utilizados como ingredientes nutracéuticos en el desarrollo de alimentos funcionales o como productos farmacéuticos.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Los frijoles son las semillas de leguminosa más importantes para el consumo humano en el mundo, sin embargo esta semilla se encuentra subutilizada, ya que únicamente es consumida debido a su bajo costo, sin tomar en cuenta su elevado contenido de proteínas. Las especies de frijol “flor de mayo” y “pinto” son consumidas en menor cantidad que el frijol común (frijol negro), por lo cual los productores se ven obligados a ofertar precios muy bajos o utilizar la cosecha para autoconsumo.

Una manera de aprovechar estas cosechas es la obtención de fracciones peptídicas, de las cuales es posible obtener péptidos bioactivos que podrían ayudar a mejorar la calidad de vida de personas con diferentes enfermedades; las actividades biológicas que pueden presentar estos péptidos bioactivos son: anticancerígena, antihipertensiva, antiolesterolémica, antimicrobiana, antioxidante, anticariogénica, entre otras.

Los antioxidantes tienen una elevada importancia en la dieta diaria debido a que estos son capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas; estas reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. El estrés oxidativo ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades humanas, por lo que se estudia de forma intensiva el uso de antioxidantes, particularmente como tratamiento para accidentes cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas; los antioxidantes son también ampliamente utilizados como ingredientes en suplementos dietéticos con la esperanza de prevenir enfermedades como el cáncer y la cardiopatía isquémica.

Por otro lado, una gran parte de la población presenta problemas dentales debido a la mala alimentación o falta de higiene; para la corrección de estos problemas dentales se emplean tratamientos prolongados y costosos que en ocasiones resultan poco accesibles para cierta fracción de la población; por lo que se pretende emplear fracciones peptídicas que presenten actividad anticariogénica para la corrección de estas patologías, a través de la recalificación del esmalte dental.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Obtener y caracterizar fracciones peptídicas de dos variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y evaluarlos como componentes bioactivos.

### 5.2 Objetivos específicos

- a) Obtener y caracterizar física y químicamente la harina y concentrado proteínico obtenido a partir de frijol flor de mayo y frijol pinto.
- b) Evaluar cinéticas y grado de hidrólisis del concentrado proteínico mediante la aplicación de tratamientos enzimáticos.
- c) Evaluar la actividad biológica antioxidante *in vitro* de los hidrolizados proteínicos.
- d) Evaluar la actividad biológica anticariogénica *in vitro* de los hidrolizados proteínicos.
- e) Obtener las fracciones peptídicas mediante ultrafiltración de los hidrolizados proteínicos y evaluar su actividad biológica.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **A) MATERIALES**

#### **6.1 Obtención de la materia prima**

Se emplearon granos de frijol flor de mayo y frijol pinto obtenidos en el comercio local. Los granos fueron trasladados a los laboratorios de Ciencia de los Alimentos e Ingeniería de Alimentos del Instituto Tecnológico de Tuxtepec, donde fueron procesados.

Todos los reactivos utilizados en los análisis fueron de marcas registradas como Sigma, J. T. Baker (Phillisburg, NJ, USA). Las enzimas se adquirieron de los laboratorios Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

### **B) MÉTODOS**

#### **6.2 Obtención de la harina de frijol flor de mayo y frijol pinto**

Los granos se limpiaron manualmente seleccionando los mejores y eliminando las impurezas que contenían, posteriormente fueron molidos en una licuadora industrial Tapisa® modelo T 5L seguido de una molienda en un molino de café KRUPS GX4100 hasta obtener una harina capaz de pasar a través de una malla No 80 (0.177 mm) (Segura Campos et al., 2010).

#### **6.3 Obtención del concentrado proteínico**

Se empleó el método reportado por Guerra-Almonacid et al. (2015). La harina se dispersó en NaOH pH 11 en una relación 1:10 p/v y se agitó por 1:30 h a 400 rpm (Caframo RZ-1), posteriormente la suspensión se centrifugó a 5000 rpm durante 30 min. El sobrenadante fue llevado a punto isoeléctrico (4.5) con HCl 0.1 N y se dejó reposar para posteriormente retirar la mayor cantidad posible de sobrenadante. El residuo sólido se centrifugó a 5000

rpm durante 30 min y el precipitado se lavó cinco veces con agua destilada. El precipitado fue secado a  $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $13 \times 10^{-3}$  mbar en una liofilizadora (Labconco).

#### **6.4 Composición proximal de la harina y el concentrado proteínico de frijol flor de mayo y frijol pinto**

La composición química proximal se determinó de acuerdo con los métodos siguientes (AOAC, 2012):

Humedad (Método 925.09): se determinó por la pérdida de peso después de secar la muestra en estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h.

Proteína cruda (Método 954.01): se determinó mediante el método micro-Kjeldahl, por digestión ácida y destilación alcalina, usando 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína.

Grasa cruda (Método 920.39): se cuantificó después de la extracción de la muestra durante 3 h con éter de petróleo en un sistema Soxhlet.

Fibra cruda (Método 962.09): se calculó el residuo orgánico combustible e insoluble que se obtuvo después de que la muestra fue sometida a digestiones ácida y alcalina.

Cenizas (Método 923.03): se calculó como el peso remanente después de calcinar la muestra en una mufla a  $550\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 4 h.

Extracto libre de nitrógeno (ELN): los carbohidratos totales se estimaron por diferencia al 100% como el extracto libre de nitrógeno (ELN).

El valor energético de las harinas y concentrados proteínicos fueron calculados en kilojoules mediante la multiplicación de los porcentajes de la proteína, grasas y carbohidratos por los factores 16.7, 37.7 y 16.7 respectivamente (Juárez-Barrientos et al., 2017).

#### **6.5 Determinación de color de la harina y concentrado proteínico**

El color de la harina y del aislado proteínico se determinó mediante un colorímetro UltraScan® Vis (HunterLab, Hunter Associates Laboratory Inc., 11491 Sunset Hills Road,

Reston, Virginia U.S.A). Se obtuvieron los valores  $L^*$  (Luminosidad),  $a^*$  (grado de color desde –verde a +rojo) y  $b^*$  (grado de color desde –azul a +amarillo). El equipo instrumental fue calibrado con un estándar blanco. La diferencia total de color  $\Delta E$  fue calculado como:

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2} \quad (1)$$

Donde  $\Delta L$  es la diferencia entre el valor  $L^*$  del estándar y la muestra,  $\Delta a$  es la diferencia entre el valor de  $a^*$  del estándar y la muestra,  $\Delta b$  es la diferencia entre el valor  $b^*$  del estándar y la muestra (Wani et al., 2013).

## 6.6 Hidrólisis del concentrado proteínico

La hidrólisis enzimática se efectuó empleando las enzimas comerciales Pepsina y Pancreatina, de manera secuencial. La hidrólisis se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Herrera-Chalé et al. (2014), con algunas modificaciones. La hidrólisis se llevó a cabo con una concentración de sustrato de 4%, una relación enzima-sustrato en una proporción 1:10, temperatura de 37 °C, pH 2 para pepsina, pH 7.5 para pancreatina, durante 10, 20, y 30 min para cada enzima. Las hidrólisis se detuvieron colocando las muestras en un baño de agua a 80 °C durante 20 min, finalmente se centrifugaron a  $1317 \times g$  por 20 min, la porción soluble se conservó en congelación.

## 6.7 Determinación del grado de hidrólisis

Se determinó el grado de hidrólisis (%GH) utilizando el método reportado por Kim et al. (1990). Este se estimó midiendo la cantidad de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 10% y su proporción con respecto a la cantidad de nitrógeno total en la suspensión del concentrado proteínico según la fórmula:

$$\% GH = \frac{\text{Nitrógeno soluble en TCA al 10\%}}{\text{Nitrógeno total}} \times 100 \quad (2)$$

Para evaluar la cantidad de nitrógeno soluble en TCA se tomaron 10 mL del hidrolizado y se mezclaron con 10 mL de TCA al 10%. Esta mezcla se centrifugó a  $12,100 \times g$  por 15 min y el nitrógeno presente en el sobrenadante se determinó por el método Kjeldahl (AOAC, 2012).

## 6.8 Determinación de la actividad antioxidante

Se determinó la capacidad antioxidante de los hidrolizados proteínicos y las fracciones peptídicas por los métodos 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) y 2,2,-azino-bis-(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfónico) o ABTS.

### 6.8.1 Método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•)

Se pesaron 2.4 mg del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) y se aforó a 100 mL con metanol. Se prepararon las muestras tomando como inicio 10000 ppm; se hicieron diluciones a 5000, 2500, 1250, 625, 313, 156, 78, 39 y 20 ppm. Posteriormente los tubos Eppendorf fueron forrados con aluminio y se les agregaron 975  $\mu\text{L}$  de DPPH• y 25  $\mu\text{L}$  de muestra; los cuales se dejaron reposar durante 15 min en total oscuridad. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a 515 nm (Braca et al., 2002).

La capacidad antiradicalaria fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$\% DPPH = \frac{Ac - Am}{Ac} \times 100 \quad (3)$$

#### Donde:

% DPPH: actividad antiradicalaria

Ac: Absorbancia control

Am: Absorbancia de la muestra

### 6.8.2 Método 2,2,-azino-bis-(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfónico) o ABTS•

Se realizó por el método descrito por Re et al. (1999); en el cual se pesaron 77.6 mg de reactivo ABTS• y se adicionaron 20 mL de agua destilada para obtener una concentración de 7 mM en solución acuosa. Posteriormente se pesaron 13.2 mg de persulfato de potasio (2.45 mM) y se hicieron reaccionar en un frasco ámbar con la solución de ABTS•. Se homogenizaron y cubrieron con aluminio; para incubarlas entre 12-16 h a temperatura ambiente antes de su uso y fueron almacenadas a temperatura ambiente. La solución ABTS• se diluyó en etanol absoluto hasta obtener una absorbancia inicial de  $0.7 \pm 0.02$  a 732 nm.

La capacidad antiradicalaria fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$\% ABTS = \frac{Ac-Am}{Ac} \times 100 \quad (4)$$

**Donde:**

% ABTS: actividad antiradicalaria

Ac: Absorbancia control

Am: Absorbancia de la muestra

### 6.9 Determinación de actividad anticariogénica

Se realizó siguiendo la metodología descrita por Warner et al. (2001), que consiste en una determinación *in vitro* utilizando hidroxipatita (HA) simulando el esmalte dental. Consiste en hacer una suspensión de HA (2 mg/mL) en un buffer 0.1 M de Tris-HCl (pH 7). También se empleó buffer de acetato de sodio 0.4 M (pH 4.2) para representar los ácidos orgánicos presentes en la boca. Se prepararon las suspensiones de las muestras con agua destilada a una concentración de 0.8 mg/mL. El sobrenadante fue utilizado para medir los niveles de Calcio disueltos por acción del buffer de acetato de sodio.

### **6.10 Obtención de las fracciones peptídicas por ultrafiltración**

La porción soluble del hidrolizado fue sometida a una separación mediante el uso de una celda de ultrafiltración equipado con un agitador magnético para evitar el sedimento de la muestra sobre la membrana. Se utilizó una membrana con un corte de peso molecular de 10 kDa, obteniéndose con ello dos fracciones peptídicas, por lo que se colectaron de manera separada tanto el retenido, como el permeado. Las fracciones peptídicas obtenidas se denominaron como: >10 kDa y <10 kDa (Cho et al., 2004).

### **6.13 Análisis estadístico**

Todos los resultados obtenidos fueron procesados mediante estadística descriptiva, utilizando medidas de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar), los datos obtenidos de los análisis químico proximal, color, hidrólisis enzimática, actividad antioxidante y anticariogénica, fueron evaluados mediante un análisis de varianza de una vía y en todos los casos se realizó una comparación de medias por el método de mínima diferencia significativa (LSD, por su acrónimo en inglés *Least Significant Difference*) para establecer las diferencias entre los tratamientos. Todos estos análisis se efectuaron utilizando el paquete computacional Minitab® 17 (Montgomery, 2007).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Caracterización proximal de la harina y concentrado proteínico de frijol flor de mayo y frijol pinto.

La caracterización proximal de las harinas y concentrados proteínicos de frijol flor de mayo y frijol pinto se muestran en la Tabla 7. Se obtuvo un contenido de humedad en la harina de frijol flor de mayo de 7.28% y en la harina de frijol pinto de 7.79%; mientras que el contenido de humedad en los concentrados proteínicos de ambas leguminosas fue de 6.09 y 5.81% respectivamente; mostrando diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las harinas y los concentrados proteínicos. Los datos obtenidos fueron similares a los reportados por De Luna & Ponce (1994); ya que en la harina de frijol flor de mayo presentó un porcentaje de humedad de 7.98%. Además, el contenido de humedad hallado en la presente investigación fue ligeramente menor a lo reportado para el frijol jamapa (*Phaseolus vulgaris*) con un contenido de 8.8% (Torruco-Uco et al., 2009). Mientras que Du et al. (2014) reportaron en frijol pinto (*Phaseolus vulgaris* L.) un contenido del 10.0%, frijol rojo (*Phaseolus vulgaris* L.) con un contenido de 9.2%, frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) con 9.4%, frijol blanco (*Phaseolus vulgaris* L.) con 9.7%, frijol arroz rojo (*Vigna umbellata* L.) con 9.8%, frijol mungo (*Vigna radiata* L.) 9.5% y frijol caupí (*Vigna sinensis* S.) con 9.7%. De igual forma estos valores fueron menores a los encontrados por Aguirre & Gómez-Aldapa (2010) para el frijol Bayo Victoria, el frijol pinto Saltillo y el frijol negro San Luis con 10.16, 11.58 y 11.95% respectivamente. El contenido de humedad se relaciona con la edad de la semilla y el manejo postcosecha, así como con los métodos y condiciones de procesamiento (Salunke et al., 1985). La diferencia entre los valores de humedad hallados en este estudio, comparado con otras leguminosas, puede ser atribuido a la diferencia microestructural entre los materiales, el cual puede darle mayor o menor capacidad para ligar moléculas de agua (Betancur-Ancona et al., 2009).

**Tabla 7.** Composición química proximal de las harinas y concentrados proteínicos de frijol flor de mayo y frijol pinto.

| Componentes<br>(%)          | Harinas                   |                           | Concentrados proteínicos  |                           |
|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                             | Flor de mayo              | Pinto                     | Flor de mayo              | Pinto                     |
| Humedad                     | 7.28 ± 0.17 <sup>b</sup>  | 7.79 ± 0.52 <sup>b</sup>  | 6.09 ± 0.38 <sup>a</sup>  | 5.81 ± 0.47 <sup>a</sup>  |
| Proteína                    | 17.87 ± 0.08 <sup>a</sup> | 17.90 ± 0.03 <sup>a</sup> | 73.31 ± 0.09 <sup>b</sup> | 79.18 ± 0.37 <sup>c</sup> |
| Grasa                       | 3.98 ± 0.18 <sup>b</sup>  | 2.55 ± 0.59 <sup>a</sup>  | 7.27 ± 0.10 <sup>d</sup>  | 5.87 ± 0.09 <sup>c</sup>  |
| Fibra Cruda                 | 1.92 ± 0.45 <sup>a</sup>  | 1.48 ± 0.16 <sup>a</sup>  | 1.84 ± 0.40 <sup>a</sup>  | 1.16 ± 0.63 <sup>a</sup>  |
| Cenizas                     | 3.89 ± 0.07 <sup>c</sup>  | 4.75 ± 0.04 <sup>d</sup>  | 2.94 ± 0.08 <sup>a</sup>  | 3.75 ± 0.05 <sup>b</sup>  |
| ELN                         | 72.34 ± 0.51 <sup>c</sup> | 73.31 ± 0.95 <sup>c</sup> | 21.13 ± 0.86 <sup>b</sup> | 17.21 ± 1.56 <sup>a</sup> |
| Energía total<br>(kJ/100 g) | 1659.46                   | 1622.51                   | 1852.30                   | 1834.22                   |

Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar y expresados en porcentaje (%) en base seca con excepción de humedad. <sup>a-b</sup>Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). ELN = extracto libre de nitrógeno, calculado por diferencia de los demás componentes.

Por otro lado, el contenido de humedad de los concentrados hallados en el presente estudio fue menor al contenido de humedad de concentrados proteínicos de otras fuentes botánicas, como son *Canavalia ensiformis* (8.71%) (Chel-Guerrero et al., 2002), *Phaseolus vulgaris* (6.5%) (Torruco-Uco et al., 2009) y *Phaseolus vulgaris* L. (7.38-9.55%) (Wani et al., 2014). El menor contenido de humedad hallado en el concentrado proteínico representa una ventaja en términos de vida de anaquel y preservación de la calidad del concentrado proteínico y es atribuido a la etapa de liofilización que se llevó a cabo durante el proceso de obtención del mismo (Adebowale, et al., 2005; Herrera-Chalé et al., 2014).

En lo que respecta a los valores de proteína las harinas evaluadas mostraron un contenido de 17.87 y 17.90% respectivamente, no siendo significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) entre sí; mientras que en los concentrados proteínicos éstos valores fueron de 73.31% para frijol flor de mayo el cual mostró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con el frijol pinto con

79.18%. El contenido proteínico hallado en la harina fue similar a lo obtenido por Zaragoza et al. (2013) para Flor de Junio (20%) y Flor de Mayo Anita (21%). Así mismo es similar a lo reportado para el frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y frijol de chancho (*Canavalia ensiformis*) con un contenido de proteína de 24.07 y 26.86%, respectivamente (Chel-Guerrero et al., 2002); frijol pinto (*Phaseolus vulgaris* L.) con 22.80%, frijol rojo (*Phaseolus vulgaris* L.) con 25.60%, frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) con 25.37%, frijol blanco (*Phaseolus vulgaris* L.) con 25.73%, frijol arroz rojo (*Vigna umbellata* L.) con 25.68% y frijol caupí (*Vigna sinensis* S.) con 24.58% (Du et al., 2014).

Con respecto a lo hallado en los concentrados proteínicos, se han reportado contenidos de proteína similares a lo encontrado en este estudio, Chel-Guerrero et al. (2002) reportaron valores de 73.75% para el concentrado proteínico de frijol de chancho y 71.13% para el concentrado proteínico de frijol lima; mientras que Rodríguez-Canto (2014) obtuvo un contenido de proteínas de 74.06 y 68.29% para los concentrados proteínicos de frijol lima y caupí respectivamente. Se deben considerar algunas características que diferencian el contenido proteínico encontrado en el presente trabajo y las investigaciones antes citadas, como son: el tipo de suelo donde fueron cosechadas las vainas del frijol, la altitud a la cual se realizó la siembra, temperatura del medio ambiente, tiempo y estación de maduración de las vainas y el método de sembrado (Brunner et al., 2011).

En cuanto al contenido de grasa cruda, la harina de frijol flor de mayo y frijol pinto tuvieron un valor de 3.98 y 2.55% respectivamente, mientras que en el concentrado proteínico se obtuvieron valores de 7.27 y 5.87% respectivamente, siendo estos valores significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) entre ellos. El contenido de grasa cruda hallado en la harina de estas variedades fue semejante a lo obtenido por Siddhuraju & Becker (2005), quienes reportaron un contenido de grasa cruda de 4.34%, para un frijol terciopelo. Del mismo modo Betancur-Ancona et al. (2008) reportaron valores de 2.8%, para la harina de frijol terciopelo, y Ngatchic et al. (2013), obtuvieron contenidos de grasa cruda de 7.1% para el concentrado proteínico de *M. pruriens*. Mientras que el contenido de grasa cruda hallado en el concentrado proteínico de frijol pinto fue similar a lo reportado para otras fuentes botánicas, las cuales, presentaron contenidos de grasa cruda en el concentrado

proteínico de 5.12% para frijol de chanco (*Canavalia ensiformis*) (Chel-Guerrero et al., 2002) y 4.7% para frijol Jamapa (*Phaseolus vulgaris*) (Torruco-Uco et al., 2009). De la misma forma que en el presente trabajo, estos estudios presentaron un mayor contenido de grasa cruda en el concentrado proteínico, esto fue atribuido a la saponificación de los lípidos en el medio alcalino producido con hidróxido de sodio (pH 11) durante la concentración proteínica, provocando que estos lípidos saponificados se hayan solubilizado en la fase acuosa, para después ser acarreados junto con el precipitado proteínico, siendo esta saponificación dependiente de la composición de ácidos grasos de cada leguminosa usada en los estudios antes mencionados (Sánchez-Vioque et al., 1999; Chel-Guerrero et al., 2002; Torruco-Uco, 2009).

El contenido de fibra cruda en la harina de frijol flor de mayo y frijol pinto fue 1.92 y 1.48% respectivamente. En comparación con otros autores, el contenido de fibra cruda fue menor, ya que, Siddhuraju & Becker (2005) encontraron valores de fibra cruda de 7.35% en la harina de *M. pruriens* cosechado en la India; de igual forma Agbede & Aletor (2005), obtuvieron 7.1%, para los granos de frijol terciopelo cultivado en Akure, Nigeria. Sin embargo, estos valores son similares a los obtenidos por Aguirre & Gómez-Aldapa (2010), para frijol pinto Saltillo y frijol negro San Luis (1.35 y 1.77% respectivamente). Las diferencias entre los resultados de los estudios antes citados y los resultados obtenidos en el presente trabajo, es debido principalmente a las condiciones de cultivo, madurez del grano y variedad de las especies (Chel-Guerrero et al., 2002). Sin embargo, en el concentrado proteínico los contenidos de fibra cruda en ambas variedades disminuyó a 1.84 y 1.16%, respectivamente. Este comportamiento ha sido observado para la harina y concentrado proteínico de *M. pruriens*, en las investigaciones hechas por Corzo-Ríos et al. (2000), con una disminución de 9.42 a 0.35%, usando granos de frijol terciopelo cosechados en el ejido La Libertad, Escárcega, Campeche, México; Betancur-Ancona et al. (2008) hallaron una disminución de 9.4 a 3%, en estudios hechos a partir de *M. pruriens* proveniente de Calkiní, Campeche, México.

El contenido de cenizas encontrado en la harina de frijol flor de mayo fue de 3.89% y en el frijol pinto de 4.75%, mientras que en el concentrado fue 2.94 y 3.75% respectivamente,

mostrando que hay diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre estos valores. Los valores obtenidos en la harina son similares a los obtenidos por Aguirre & Gómez-Aldapa (2010) para frijol pinto Saltillo (3.80%) y negro San Luis (3.87%); así como a los obtenidos para el frijol flor de mayo (4.08%) estudiado por De Luna & Ponce (1994). Sin embargo, en el trabajo realizado por Betancur-Ancona et al. (2008), se presentó un aumento en el contenido de cenizas en el concentrado proteínico en comparación con la harina (3.5 a 5.4%), esto debido a la adición de NaOH requerido para ajustar el pH durante el proceso de concentración de las proteínas (Herrera-Chalé et al., 2014). En este trabajo, el NaOH no representó un inconveniente para el producto final.

En lo que respecta al valor energético, la harina de frijol flor de mayo y frijol pinto mostraron un valor de 1659.46 y 1622.51 kJ/100 g, mientras que los concentrados proteínicos de estas leguminosas los valores energéticos fueron de 1852.30 y 1834.22 kJ/100 g. Estos valores pueden ser comparables con los valores energéticos encontrados por Juárez-Barrientos et al. (2017) quienes reportaron un contenido energético de 1660.96 y 1694.81 kJ/100 g para la harina de semilla de jaca cruda y hervida respectivamente. Estos resultados indican que las harinas y concentrados proteínicos de frijol flor de mayo y frijol pinto pueden ser añadidos a sopas, caldos, jugos u otros alimentos que contengan bajo nivel calórico ayudándolos a elevar de manera significativa su valor energético.

## **7.2 Color de la harina y concentrado proteínico de frijol flor de mayo y frijol pinto.**

Los resultados de color, obtenidos para la harina y concentrado proteínico de ambas variedades de frijol se muestran en la Tabla 8. La harina de frijol flor de mayo tuvo un valor de luminosidad ( $L^*$ ) de 87.14, mientras que la harina de frijol pinto obtuvo un valor  $L^* = 87.38$ ; por lo que no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre ellos. Así mismo los valores obtenidos en el concentrado proteínico fueron:  $L^* = 70.64$  y  $L^* = 74.29$  respectivamente, mostrando diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre ellos. En la harinas, el parámetro que va de verde a rojo (enrojecimiento) denominado como parámetro  $a^*$  fue de 4.07 para el frijol flor de mayo y 1.26 para el frijol pinto; mientras que en el concentrado proteínico el valor de  $a^*$  fue de 4.03 y 3.06 respectivamente; mientras que el parámetro que

va de azul a amarillo (amarillamiento) denominado parámetro  $b^*$  fue de 9.96 y 9.03 para las harinas, y 8.66 y 11.35 para los concentrados proteínicos, respectivamente. Estas diferencias de color se vieron reflejadas en los valores de diferencia total de color ( $\Delta E$ ) que fueron de 12.8 y 12.56 para la harina de frijol flor de mayo y frijol pinto respectivamente; mientras que en el concentrado proteínico los valores de  $\Delta E$  fueron de 29.32 y 25.21 respectivamente. Es importante mencionar que la disminución de la luminosidad en el concentrado fue provocada por el uso de NaOH durante el proceso de obtención del concentrado proteico. Este cambio de color puede ser atribuido a la eliminación del contenido de almidón que fue removido durante la obtención del concentrado proteínico, debido a que este contenido de almidón presentó un color blanco al momento de ser separado, por lo que su contribución al color del concentrado se vio reducida.

**Tabla 8.** Color de la harina y concentrado proteínico de frijol flor de mayo y frijol pinto.

| Muestras                 |              | Parámetros                |                           |                           |                           |
|--------------------------|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                          |              | $L^*$                     | $a^*$                     | $b^*$                     | $\Delta E$                |
| Estándar blanco          |              | 99.42 ± 0.32 <sup>d</sup> | -0.13 ± 0.01 <sup>a</sup> | 0.06 ± 0.01 <sup>a</sup>  | ND                        |
| Harinas                  | Flor de mayo | 87.14 ± 0.55 <sup>c</sup> | 4.07 ± 0.01 <sup>d</sup>  | 9.96 ± 0.05 <sup>d</sup>  | 12.8 ± 0.00 <sup>b</sup>  |
|                          | Pinto        | 87.38 ± 0.16 <sup>c</sup> | 1.26 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 9.03 ± 0.13 <sup>c</sup>  | 12.56 ± 0.00 <sup>a</sup> |
| Concentrados proteínicos | Flor de mayo | 70.64 ± 0.55 <sup>a</sup> | 4.036 ± 0.47 <sup>d</sup> | 8.663 ± 0.32 <sup>b</sup> | 29.32 ± 0.00 <sup>d</sup> |
|                          | Pinto        | 74.29 ± 0.24 <sup>b</sup> | 3.06 ± 0.37 <sup>c</sup>  | 11.35 ± 0.45 <sup>e</sup> | 25.21 ± 0.00 <sup>c</sup> |

Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. <sup>a-b</sup>Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), exceptuando el estándar blanco. ND = no determinado.

Autores como Aguirre & Gómez-Aldapa (2010) reportaron para la harina del frijol pinto Saltillo un valor de  $L^* = 70.125$ ; inferior a los observados en esta investigación. Mientras que en el parámetro  $a^*$  obtuvieron un valor de 3.575 el es similar al reportado anteriormente.

La formación de un color oscuro es indeseable en algunos alimentos debido a que afecta adversamente la comerciabilidad, calidad sensorial e incluso el valor nutricional del

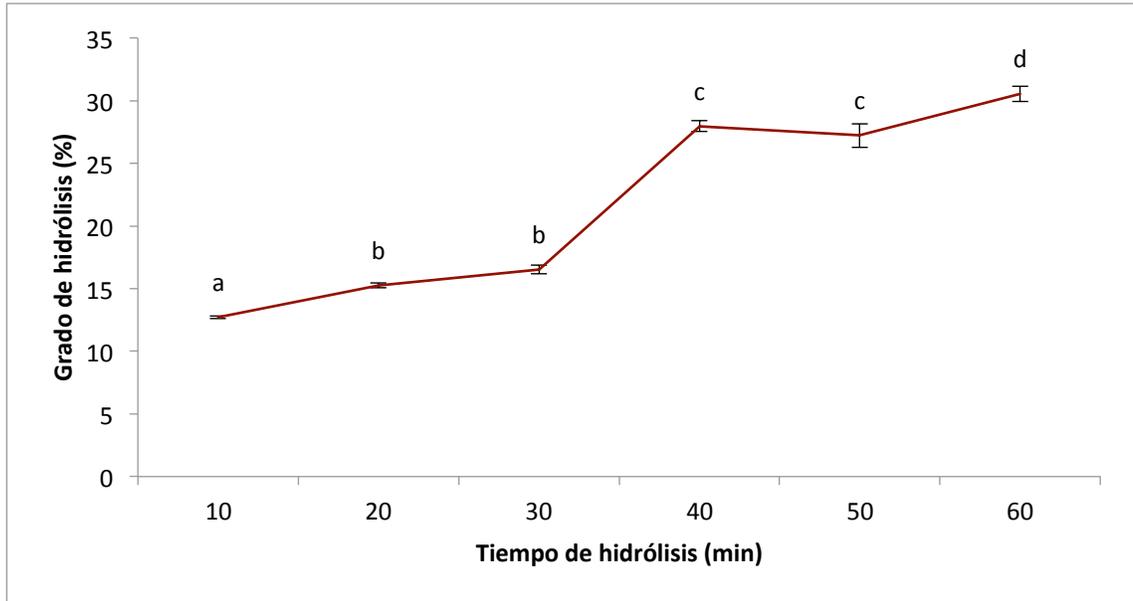
producto final. Adebawale et al. (2007), obtuvo un color más aceptable, usando ácido ascórbico al 0.5% o sulfito de sodio al 0.25% como medio de extracción durante la obtención del concentrado proteínico, debido a que inhiben el oscurecimiento enzimático por reacción con los grupos carbonilos intermediarios impidiendo la reacción de oscurecimiento. Sin embargo el sulfito de sodio ha sido prohibido en los productos alimenticios debido al riesgo que representa para la salud humana. El ácido ascórbico ha sido usado para inhibir el oscurecimiento en frutas frescas y congeladas. Sin embargo, estos autores, reportaron que el mejor rendimiento de proteína fue hallado usando el medio alcalino producido con NaOH, haciendo más accesible a las proteínas de estas variedades de frijol a la digestión enzimática debido a que son parcialmente desnaturalizadas. Además de esto, los constituyentes nitrogenados del frijol, al igual que otras leguminosas, son altamente solubles en NaOH.

### **7.3 Hidrólisis del concentrado proteínico de frijol flor de mayo y frijol pinto.**

Durante la hidrólisis de proteínas, el parámetro clave para el monitoreo de la reacción, es el grado de hidrólisis (GH), el cual es definido como el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos. El GH está determinado por las condiciones establecidas durante la hidrólisis (concentración del sustrato, relación enzima sustrato, tiempo, pH, temperatura, tipo de enzima y actividad enzimática). El sistema enzima-proteína y los parámetros de hidrólisis usados, tienen influencia directa sobre la forma de la curva de hidrólisis. El GH es útil para comparar las propiedades entre diferentes hidrolizados proteínicos. En el presente trabajo, se realizó la determinación del GH utilizando Ácido Tricloroacético (TAC) (Kim et al., 1990).

El concentrado proteínico de frijol flor de mayo hidrolizado de manera secuencial con las enzimas Pepsina-Pancreatina se muestra en la figura 6, el cual presentó un GH = 12.71% en los primeros 10 min de reacción al utilizar la enzima Pepsina, observándose una diferencia en el incremento de GH al adicionar la enzima Pancreatina a los 30 min de reacción,

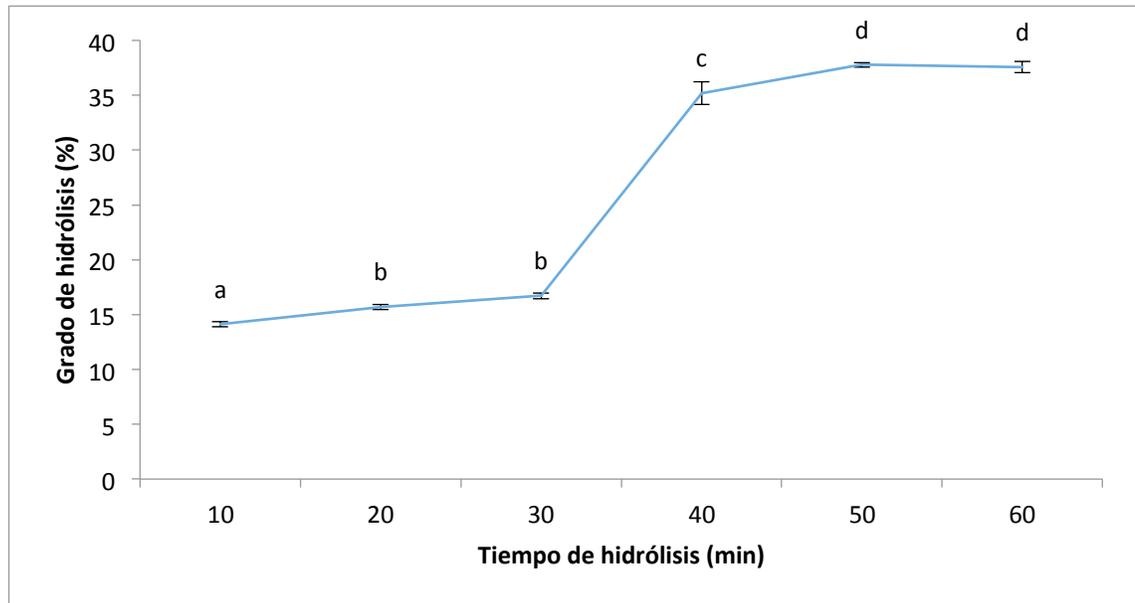
obteniendo el mayor GH a los 60 min de reacción (30.55%). Los tiempos de 20 y 30 min así como 40 y 50 min no muestran diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ) entre ellos.



**Figura 6.** Hidrólisis enzimática del concentrado proteínico de frijol flor de mayo con sistema secuencial Pepsina-Pancreatina.

Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>a-d</sup>Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

En la Figura 7 se muestra la cinética de hidrólisis del concentrado proteínico de frijol pinto realizada con las mismas condiciones empleadas para la variedad flor de mayo. A los 10 min de reacción se presentó un GH = 14.12%, mientras que a los 20 y 30 min éstos fueron de 15.71 y 16.71% respectivamente, no mostrando diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre ellos. La actividad de la enzima Pancreatina produjo un GH = 35.21% a los 40 min de iniciada la reacción, obteniendo a los 50 min un GH de 37.78% el cual no mostró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) con el GH obtenido a los 60 min de reacción (37.58%).



**Figura 7.** Hidrólisis enzimática del concentrado proteínico de frijol pinto con sistema secuencial Pepsina-Pancreatina.

Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>a-d</sup>Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

Los GH obtenidos en este estudio fueron similares a los obtenidos por Megías et al. (2004), quienes reportaron un GH de 37%, después de 360 min de reacción secuencial con pepsina y pancreatina, a partir de un aislado proteínico de girasol (*Helianthus annuus* L.), mientras que Segura-Campos et al. (2010), obtuvieron un GH de 35.74% para un hidrolizado secuencial pepsina-pancreatina a partir de un concentrado proteínico de frijol caupí (*Vigna unguiculata*) durante 90 min de reacción. Así mismo Barbana & Boye (2010), hidrolizaron el concentrado proteínico de dos variedades de garbanzo provenientes de tres cultivos, usando un sistema enzimático secuencial con pepsina, tripsina y quimiotripsina durante 150 min, reportando GH de 31.08, 34.41 y 40.78%. Estos mismos investigadores realizaron la hidrólisis de dos variedades de lentejas (*Common Blaze* y *Laird*) usando el mismo sistema secuencial (pepsina, tripsina y quimiotripsina), encontrando GH de 27.08 y 29.07% para ambas variedades respectivamente (Barbana & Boye, 2011), siendo estos valores menores a

los hallados en el presente estudio. En otro estudio realizado por Ruiz-Ruiz et al. (2013b), realizaron un estudio donde compararon hidrolizados hechos con sistemas secuenciales alcalasa-flavourzima y pepsina-pancreatina por 90 min a partir del aislado proteínico de *Phaseolus vulgaris* L. y hallaron valores de GH de 43.01 y 26.15% para ambos sistemas respectivamente, siendo el último valor, menor a lo encontrado en el presente estudio. Por otro lado, Guzmán-Méndez et al. (2014), reportaron un GH de 28.78% para un hidrolizado secuencial con pepsina-pancreatina de 90 min, hecho a partir del concentrado proteínico de *Phaseolus vulgaris*. Betancur-Ancona et al. (2014), obtuvieron valores de GH de 33.29 y 28.47% para hidrolizados secuenciales con alcalasa-flavourzima y pepsina-pancreatina respectivamente, a partir del concentrado proteínico del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), durante 120 min de reacción.

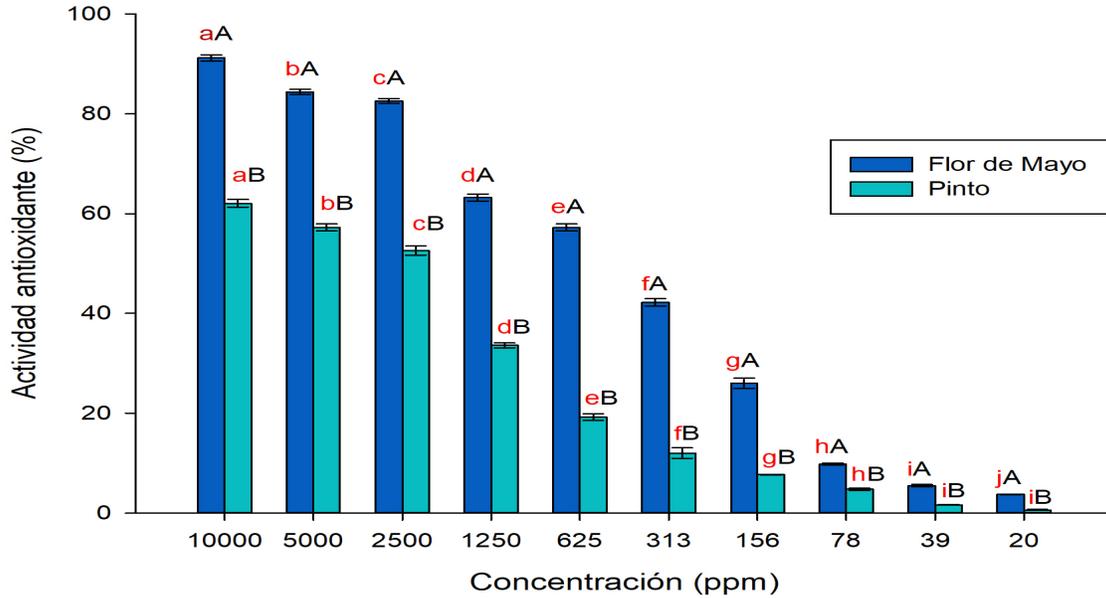
Esta variación en los GH obtenidos puede deberse a que la enzima Pancreatina es una mezcla de proteasas digestivas con actividad endopeptidasa debido a que se compone por las enzimas tripsina, quimiotripsina y elastasa, las cuales, pueden romper los enlaces extremos de los grupos carboxilo de aminoácidos básicos, aromáticos y alifáticos; también tiene actividad exopeptidasa por su composición de carboxipeptidasa A y B que escinden en el extremo C-terminal preferentemente de aminoácidos básicos e hidrofóbicos; por lo que la hidrólisis con pancreatina produce una mezcla de oligopéptidos (60 - 70%) y aminoácidos libres (30 - 40%), que pueden ser absorbidos a lo largo del intestino delgado (Luna-Vital et al., 2014; Bojórquez-Balam et al., 2013).

La liberación controlada de péptidos bioactivos mediante hidrólisis enzimática a partir de proteínas, es una de las tendencias más prometedoras en lo que concierne a aplicaciones médicas de los hidrolizados proteínicos con un grado de hidrólisis > 10%, mientras que los hidrolizados con GH < 10%, son usados para mejorar las propiedades funcionales de harinas o aislados proteínicos (Segura-Campos et al., 2010). Los péptidos con actividad biológica han sido generalmente aislados a partir de proteínas alimentarias mediante la hidrólisis con enzimas digestivas tales como, pepsina, pancreatina y quimiotripsina (Herrera-Chalé et al., 2014). Sin embargo, la producción de hidrolizados extensivos (GH > 10%), requiere el uso de más de una proteasa, debido a que una sola enzima no puede

lograr tan alto grado de hidrólisis durante un periodo de tiempo razonable (Marrufo-Estrada et al., 2013). Por esta razón, un sistema secuencial pepsina-pancreatina fue usado en el presente estudio para producir hidrolizados extensivos con un mayor GH en comparación con los sistemas enzimáticos individuales.

#### **7.4 Actividad antioxidante**

Se evaluó la actividad antioxidante de los hidrolizados proteínicos a 60 min de reacción del frijol flor de mayo y frijol pinto, mediante las metodologías ABTS• y DPPH• (Figura 8 y 9 respectivamente). La actividad antioxidante por el método ABTS• fue mayor conforme la concentración de la muestra aumentaba, logrando obtener una actividad del 90% en los hidrolizados del frijol flor de mayo y de 61% en el frijol pinto, mostrando diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las diferentes cocentraciones empleadas y entre variedades de frijol estudiadas. Estos resultados pueden ser comparables con los encontrados por Fuentes-Gutiérrez et al. (2011) quiénes evaluaron la capacidad antioxidante de los hidrolizados proteínicos a partir de tres variedades de frijol: Azufrado Higuera, Azufrado Noroeste y Azufrado Regional; la hidrólisis fue llevada a cabo con Alcalasa, Termolisina y Pancreatina de manera independiente, evaluándose esta actividad por los métodos ABTS• y DPPH• a una concentración de 1,000 ppm. Los resultados obtenidos por el método ABTS• para el frijol Azufrado Noroeste hidrolizado con Termolisina (50.2%) y con Pancreatina (50.17%); así como el frijol Azufrado Regional hidrolizado con Termolisina (57.53%) los cuales fueron similares a lo reportado en esta investigación ya que a una concentración de 2,500 ppm para el frijol pinto se obtuvo una actividad del 52.57%, mientras que a concentraciones entre 313 y 625 ppm se encontraron 42.18 y 57.21% de actividad antioxidante para el frijol flor de mayo.

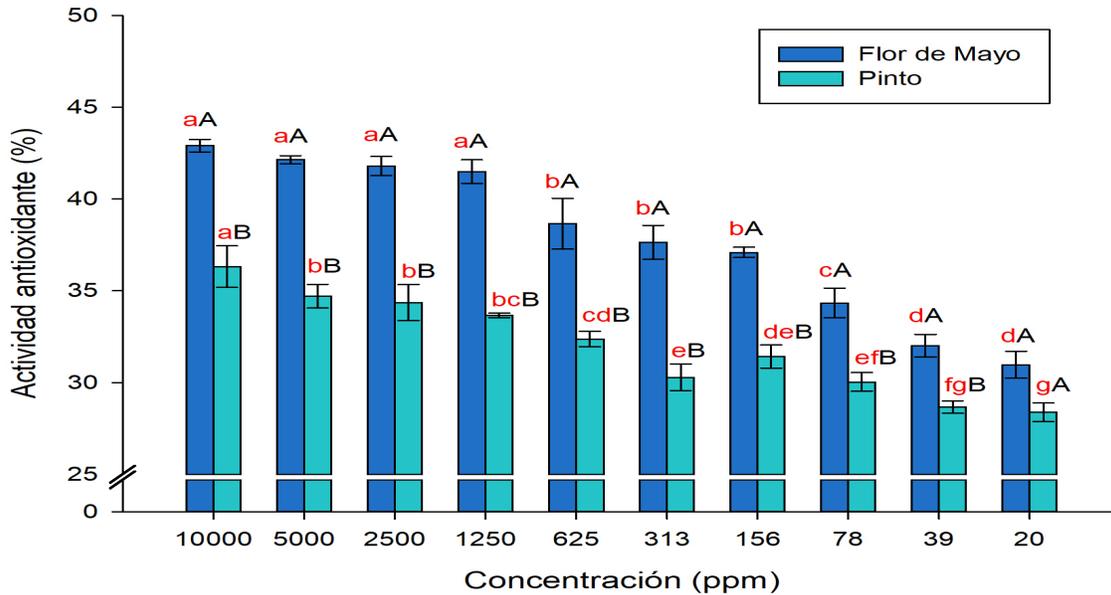


**Figura 8.** Actividad antioxidante ABTS• del hidrolizado proteínico a 60 min de frijol flor de mayo y frijol pinto.

Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>a-j</sup>Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre concentraciones, <sup>A-B</sup>letras mayúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

Por otro lado, la actividad antioxidante de los hidrolizados proteínicos evaluados por el método DPPH• mostraron la misma tendencia que por el método ABTS•, alcanzando un mayor valor de actividad de 37% en el hidrolizado de frijol pinto y de 43% en los hidrolizados de frijol flor de mayo a una misma concentración (10,000 ppm). Los resultados hallados en esta investigación pueden compararse con lo encontrado por Fuentes-Gutiérrez et al. (2011) quienes reportaron valores de actividad antioxidante por el método DPPH• de 35.81% en frijol Azufrado Regional hidrolizado con Alcalasa a una concentración de 1,000 ppm. De igual manera, Cardador et al. (2002) evaluaron el frijol negro obteniendo 36.2% de actividad antioxidante a una concentración de 1,000 ppm; mientras que en esta investigación el hidrolizado de frijol flor de mayo a una concentración de 156 ppm presentó valores de 37.5% de actividad antioxidante y a 10,000 ppm en el frijol pinto se obtuvo una actividad de 36%. Estos resultados nos indican que es posible que en la secuenciación aminoacídica de estas variedades de frijol existan aminoácidos como

Metionina, Cisteína, Triptófano, Fenilalanina, Histidina, Prolina, Valina y Leucina; ya que a estos aminoácidos se les atribuye la actividad antioxidante.



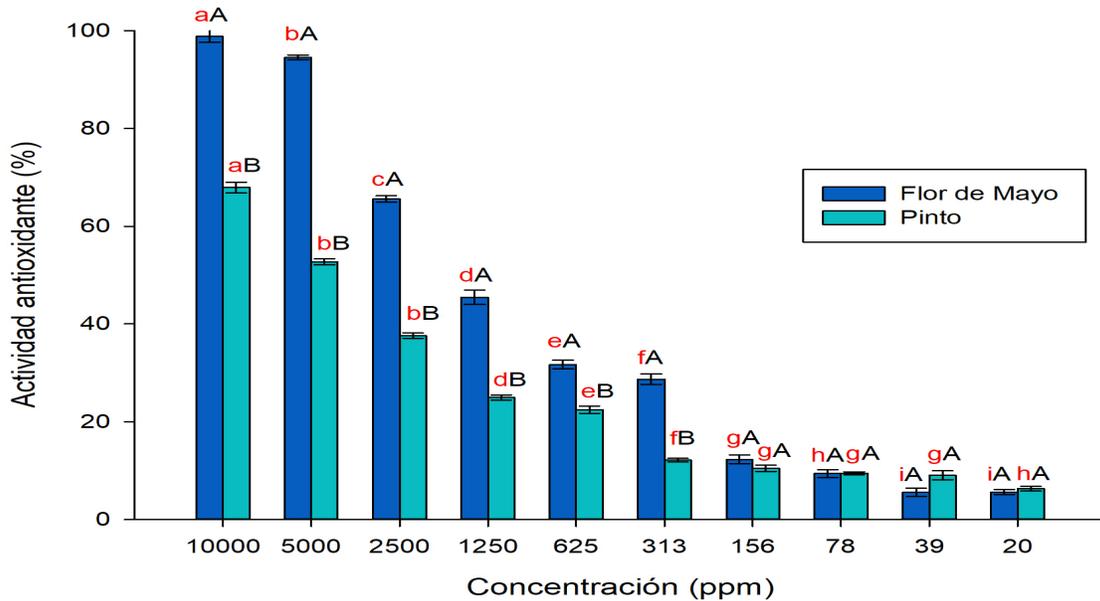
**Figura 9.** Actividad antioxidante DPPH• del hidrolizado proteínico a 60 min de frijol flor de mayo y frijol pinto.

Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>a-g</sup>Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre concentraciones, <sup>A-B</sup>letras mayúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

#### 7.4.1 Actividad antioxidante de las fracciones peptídicas separadas por ultrafiltración

Las fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración utilizando una membrana de 10 kDa, se les evaluó de la misma forma su actividad antioxidante por los métodos antes mencionados. En la Figura 10 se observa la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas  $< 10$  kDa de ambas variedades de frijol por el método ABTS•. Los resultados obtenidos muestran que existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre concentraciones, así como entre variedades hasta una concentración de 313 ppm, no siendo así a menores

concentraciones. Siendo la variedad de frijol flor de mayo la que presentó mayor porcentaje de actividad antioxidante respecto a la variedad de frijol pinto.

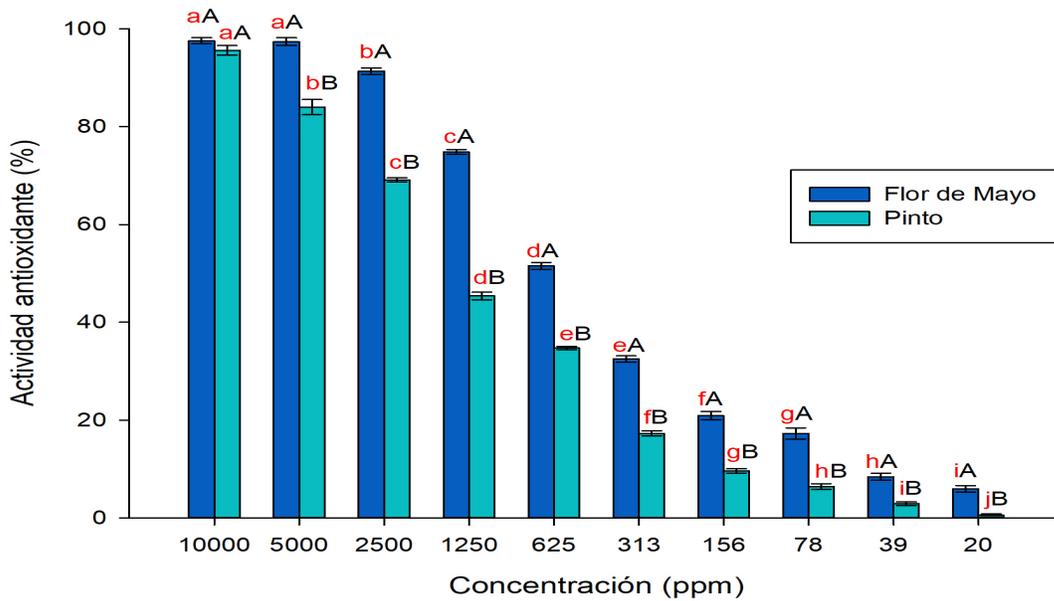


**Figura 10.** Actividad antioxidante ABTS• de las fracciones peptídicas < 10 kDa de frijol flor de mayo y frijol pinto.

Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>a-i</sup>Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre concentraciones, <sup>A-H</sup>letras mayúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

Los resultados hallados en este estudio pueden ser comparados con los de Román-Cortés et al. (2013), quienes evaluaron la actividad antioxidante de extractos vegetales de las semillas de guaje verde y rojo; con valores de 97.22% en el guaje verde y 98.11% en el guaje rojo, los cuales son similares a los obtenidos en esta investigación para el frijol flor de mayo a una concentración de 10,000 ppm (98.82%); sin embargo en el frijol pinto dichos valores no fueron alcanzados, obteniendo un máximo de 67.94% de actividad a la misma concentración. Estos resultados indican la probabilidad de que en la variedad flor de mayo existan más aminoácidos relacionados con la actividad antioxidante que en la variedad pinto, lo que hace que el porcentaje de dicha bioactividad sea mayor.

En cuanto a las fracciones > 10 kDa se puede observar la misma tendencia que en las gráficas anteriores, presentando mayor bioactividad el frijol flor de mayo respecto al frijol pinto, existiendo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre concentraciones y entre variedades (Figura 11).



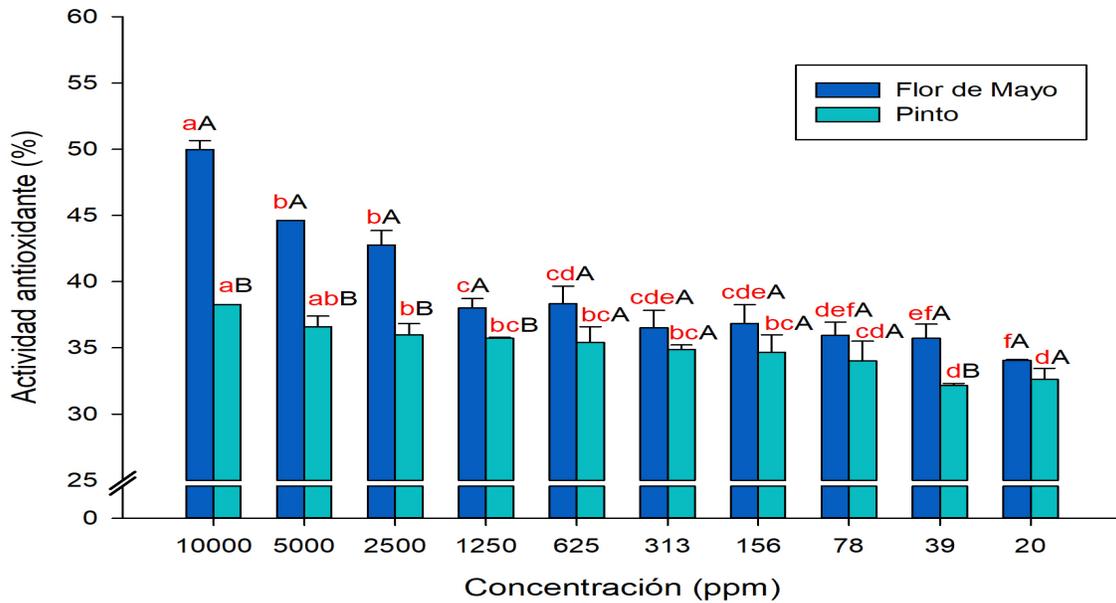
**Figura 11.** Actividad antioxidante ABTS• de las fracciones peptídicas > 10 kDa de frijol flor de mayo y frijol pinto.

Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>a-j</sup>Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre concentraciones, <sup>A-B</sup>letras mayúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

A concentraciones de 10,000 y 5000 ppm se obtuvieron 97.59 y 97.38% de actividad en el frijol flor de mayo, mientras que en el frijol pinto se obtuvo un 95.60% de actividad a una concentración de 10,000 ppm no presentaron diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre ellas. Cabe destacar que las fracciones peptídicas > 10 kDa en todas las concentraciones evaluadas presentaron mayores porcentajes de actividad antioxidante respecto a las fracciones < 10 kDa.

Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los reportados por Fuentes-Gutiérrez et al. (2011), para el frijol Azufrado Higuera (58.65%) y el frijol Azufrado Regional (57.53%) hidrolizados con Termolisina a una concentración de 1,000 ppm; ya que en el frijol flor de mayo estos valores fueron obtenidos a 625 ppm mientras que en frijol pinto este porcentaje se alcanzó entre 1,250 y 2,500 ppm. De igual manera el frijol Azufrado Higuera hidrolizado con Alcalasa (73.37%) y el frijol Azufrado Regional hidrolizado con Pancreatina (75.3%) obtuvieron valores similares a lo reportado para la variedad flor de mayo; indicando que puede existir una similitud en composición aminoacídica de estas variedades.

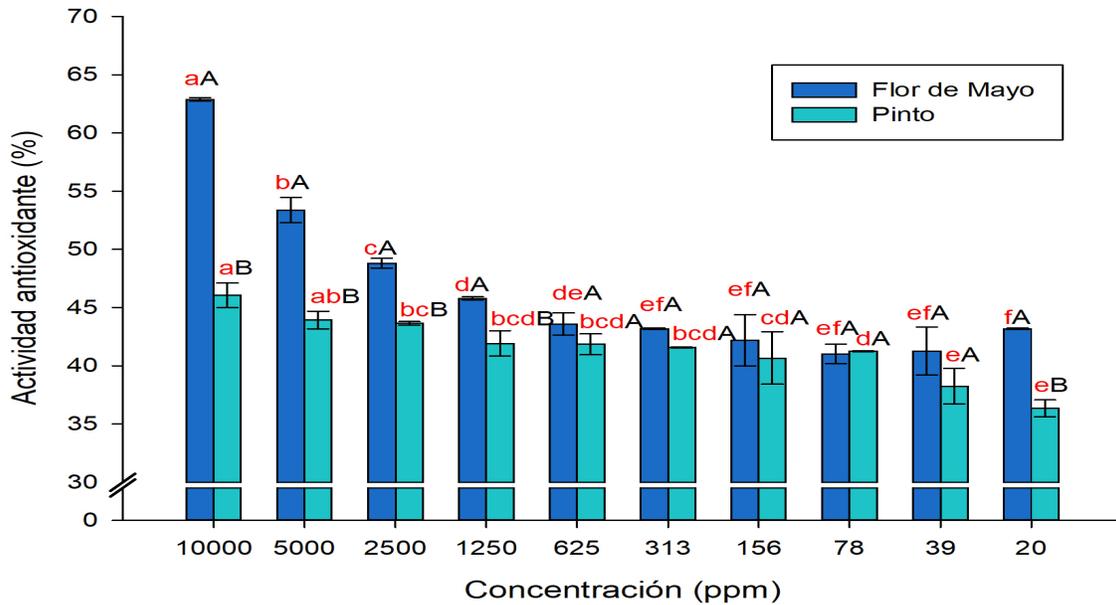
Las fracciones peptídicas < 10 kDa y > 10 kDa también fueron analizadas por el método DPPH•. Los resultados de las fracciones peptídicas < 10 kDa de ambas variedades de frijol se muestran en la Figura 12. Los valores encontrados en esta investigación pueden ser comparados con lo reportado por Fuentes-Gutiérrez et al. (2011), quienes reportaron valores de 34.03 y 35.81% para el frijol Azufrado Regional hidrolizado con Termolisina y Alcalasa respectivamente; mientras que el frijol Azufrado Higuera presentó valores de 32.16 y 33.90% hidrolizado con Termolisina y Pancreatina respectivamente. De igual forma Guzmán-Maldonado et al. (2002) analizaron la actividad antioxidante de frijol ayocote, frijol criollo y frijol silvestre a una concentración de 125 ppm, obteniendo resultados de 22.16, 20.63 y 29.18% respectivamente; los cuales son menores a lo reportado en este trabajo. Sin embargo Román-Cortés et al. (2013) reportaron valores de 94.32 y 91.7% para guaje verde y rojo respectivamente. En esta investigación se reportaron valores mayores de actividad antioxidante que en las realizadas por los investigadores antes mencionados, a la misma concentración de muestra, estas diferencias pueden deberse a la composición aminoacídica dentro de las variedades estudiadas



**Figura 12.** Actividad antioxidante DPPH• de las fracciones peptídicas < 10 kDa de frijol flor de mayo y frijol pinto.

Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>a-f</sup>Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre concentraciones, <sup>A-B</sup>letras mayúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

En la Figura 13 se presenta la actividad antioxidante de las fracciones > 10 kDa de frijol flor de mayo y frijol pinto por el método DPPH•, donde se observa una tendencia similar a la de las fracciones < 10 kDa presentando diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) solo en las primeras 4 concentraciones de frijol flor de mayo y entre 5,000 ppm y 2,500 ppm en frijol pinto.



**Figura 13.** Actividad antioxidante DPPH• de las fracciones peptídicas > 10 kDa de frijol flor de mayo y frijol pinto.

Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>a-f</sup>Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre concentraciones, <sup>A-B</sup>letras mayúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

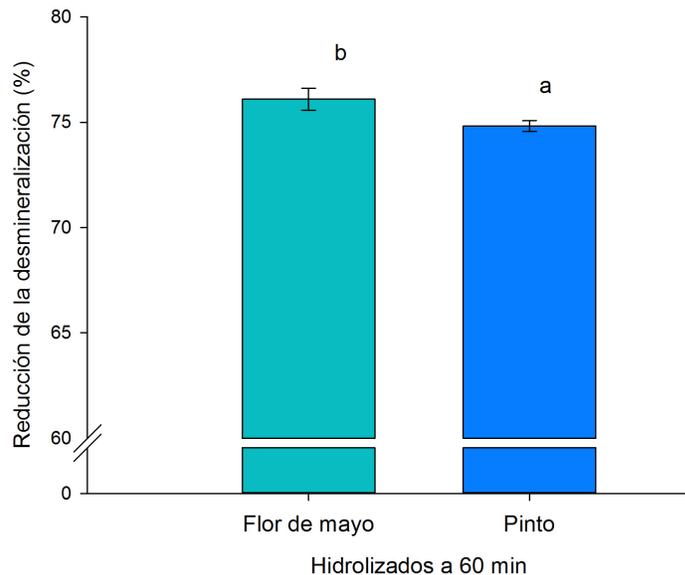
Fuentes-Gutiérrez et al. (2011), reportaron valores de 44.05% para el frijol Azufrado Higuera hidrolizado con Alcalasa y 31.03% para el frijol Azufrado Noroeste hidrolizado con Termolisina, los cuales son menores a lo reportado en esta investigación, siendo para el frijol flor de mayo 41.02% a una concentración de 78 ppm y para el frijol pinto 41.24% a 78 ppm. Es posible que las secuencias de aminoácidos necesarias para llevar a cabo la actividad antioxidante sean de un peso molecular elevado, ya que ésta se ve aumentada al separar los hidrolizados mediante ultrafiltración, y al ser evaluada en la fracción > 10 kDa.

Cuando se trabaja con actividad antioxidante, es importante analizar al menos dos metodologías, ya que cada una analiza la actividad antioxidante midiendo parámetros diferentes, como pueden ser: suprimir la generación de los primeros radicales que inician el daño oxidativo, capturar radicales libres, quelar metales, formar complejos, reducir algunos compuestos, etc (Pérez, 2007).

Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH. Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química, enzimática o electroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico. El radical ABTS tiene, además, la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm (Kuskoski et al., 2005).

### 7.5 Actividad anticariogénica

Los resultados de la actividad anticariogénica presentados en la figura 14 muestran una reducción en el porcentaje de desmineralización de Calcio de 76.09% en frijol flor de mayo y de 74.82% para frijol pinto, mostrando diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).



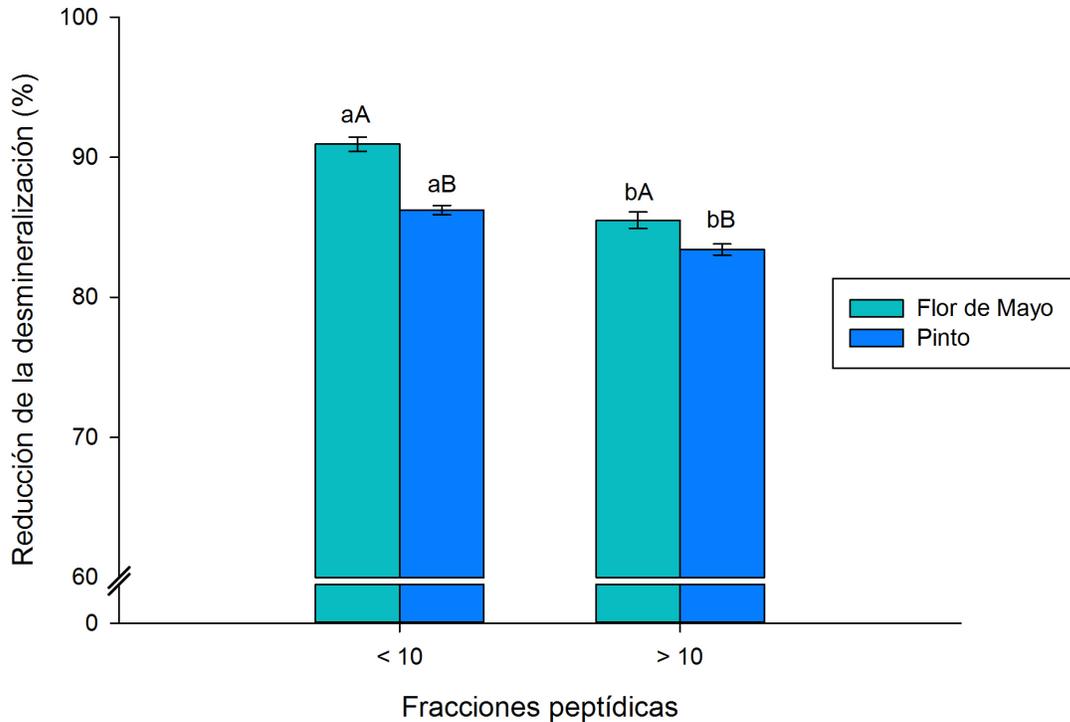
**Figura 14.** Actividad anticariogénica de los hidrolizados proteínicos a 60 min de frijol flor de mayo y frijol pinto.

Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>a-b</sup> Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

Rodríguez-Canto (2014) evaluó la reducción de desmineralización de Calcio en el hidrolizado de frijol lima y frijol caupí, obteniendo resultados de 59.75% y 50.21% respectivamente, siendo estos valores menores a los reportados en esta investigación. De igual manera Córdova et al. (2013) reportaron valores de 52.9% para los hidrolizados proteínicos de *P. lunatus* con pepsina. Warner et al. (2001) evaluaron suero de queso cottage, obteniendo una protección cercana al 30%; valor que es considerablemente inferior que los reportados en esta investigación.

### **7.5.1 Actividad anticariogénica de las fracciones peptídicas separadas por ultrafiltración**

Después de evaluar los hidrolizados proteínicos a 60 min de reacción con la hidrólisis secuencial Pepsina-Pancreatina, éstos fueron fraccionados utilizando una membrana con un corte de peso molecular de 10 kDa y se evaluó su actividad anticariogénica. Estos resultados se muestran en la Figura 15.



**Figura 15.** Actividad anticariogénica de las fracciones peptídicas de frijol flor de mayo y frijol pinto.

Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>a-b</sup> Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre fracciones, <sup>A-B</sup> letras mayúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

La fracción < 10 kDa de frijol flor de mayo mostró una reducción de desmineralización de Calcio de 90.94%, mientras que en la fracción > 10 kDa este valor fue de 85.5%; estos valores son mayores en comparación con lo obtenido en las fracciones evaluadas de frijol pinto, ya que en la fracción < 10 kDa se logró la reducción de desmineralización de Calcio en 86.23% y en la fracción > 10 kDa de 83.69%. Los valores obtenidos en esta investigación son similares a lo reportado por Warner et al. (2001) para caseinofosfopéptidos de derivados lácteos con 80% de reducción de la desmineralización. Esta diferencia en el efecto de la reducción de desmineralización se puede deber a la diferencia de cargas de los péptidos en diferentes hidrolizados, ya que los caseinofosfopéptidos tienen una mayor carga negativa debido a los grupos fosfato que

presentan, pudiendo quelatar minerales y estabilizar la desmineralización (Ruiz et al., 2013).

Por otro lado, Córdova et al. (2013) realizaron una modificación química al hidrolizado proteínico de frijol lima, agregando fosfato y pirofosfato, con lo que lograron porcentajes de reducción de desmineralización de Calcio de 68.2% y 77.3% respectivamente; con lo cual se pudo observar como el aumento de los grupos fosfatos debido a la fosforilación del hidrolizado aumentó la actividad anticariogénica. Esta mayor capacidad para neutralizar los ácidos posiblemente se debió a la estructura que presenta el pirofosfato, pues dicho compuesto cuando se enlaza mediante enlaces mono éster, a los aminoácidos serina, tirosina y/o treonina, expone más grupos (-ONa) susceptibles a neutralizar los grupos ácidos, que la mezcla de fosfatos.

## VIII. CONCLUSIONES

- ⊕ Se obtuvieron concentrados de proteínas (68.84 y 74.5%) a partir de la harina de frijol flor de mayo y frijol pinto respectivamente, que sirvieron como sustrato para la acción enzimática de pepsina y pancreatina de manera secuencial.
- ⊕ Los concentrados de ambas variedades de frijol, presentaron un color ligeramente más oscuro ( $L^* = 70.64$  y  $L^* = 74.29$ ) en comparación con las harinas ( $L^* = 87.14$  y  $L^* = 87.38$ ), por lo que estos concentrados podrían ser utilizados en sistemas alimenticios donde su contribución al color no afecte su comerciabilidad.
- ⊕ La hidrólisis del concentrado proteínico de frijol pinto presentó un mayor GH (37.78%), comparado con los valores obtenidos de la hidrólisis evaluada en el concentrado proteínico de frijol flor de mayo (30.55%). Esto indicó que se produjo hidrolizados extensivos en ambas leguminosas evaluadas.
- ⊕ El hidrolizado a 60 min de reacción de frijol flor de mayo presentó mayor valor de actividad antioxidante (91.22%) que el hidrolizado a 60 min de frijol pinto (62.06%) a una concentración de 10,000 ppm por la metodología ABTS•, teniendo éste mismo comportamiento mediante el método DPPH• (42.91 y 36.31% respectivamente).
- ⊕ El proceso de ultrafiltración (UF) ayudo a obtener fracciones peptídicas  $> 10$  kDa y  $< 10$  kDa, siendo la fracción peptídica  $> 10$  kDa del hidrolizado de frijol flor de mayo a los 60 min de reacción, mediante el método ABTS• el que presentó mayor actividad antioxidante (98.82% a una concentración de 10,000 ppm). Por lo tanto, esta fracción peptídica podría ser usada en la implementación de un modelo digestivo para verificar su viabilidad en el diseño de nuevos productos alimenticios que ayuden a prevenir la acción de los radicales libres.
- ⊕ La fracción peptídica  $< 10$  kDa del hidrolizado de frijol flor de mayo a los 60 min de reacción mostró mayor porcentaje de reducción de desmineralización de Calcio (90.94%) (actividad anticariogénica) que el hidrolizado de frijol pinto a 60 min de reacción (86.23%); por lo que esta fracción peptídica podría ser analizada en un modelo *in vivo* para verificar su viabilidad en el diseño de nuevos productos alimenticios que ayuden a prevenir la desmineralización de Calcio.

## IX. REFERENCIAS

1. Adebawale, Y. A., Adeyemi, A., & Oshodi, A. A. (2005). Variability in the physicochemical, nutritional and antinutritional attributes of six *Mucuna* species. *Food Chemistry*, 89(1), 37-48.
2. Agbede, J. O., & Aletor, V. A. (2005). Studies of the chemical composition and protein quality evaluation of differently processed *Canavalia ensiformis* and *Mucuna pruriens* seed flours. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1), 89-103.
3. Adebawale, Y. A., Adeyemi, I. A., Oshodi, A. A., & Niranjana, K. (2007). Isolation, fractionation and characterisation of proteins from *Mucuna* bean. *Food Chemistry*, 104(1), 287-299.
4. Aguirre Santos, E. A., Gómez-Aldapa, C. A. (2010). Evaluación de las Características fisicoquímicas en la especie de frijol *Phaseolus vulgaris* de las variedades: pinto Saltillo, bayo Victoria y negro San Luis. *XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos 1*.
5. Aimutis, W. (2004). Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *Journal of Nutrition* , 134 (4), 989-985.
6. Ames , B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7915-7922.
7. Amin, I.; Norazaidah, Y., and Hainida, K. I. E. (2006). Antioxidant Activity and Phenolic Content of Raw and Blanched *Amaranthus species*. *Food Chemistry*, 94: 47-52.
8. AOAC International. (2012). *Official methods of analysis* (19 ed.). Gaithersburg, MD: The Association.
9. Arboledas D. (2011). Jerarquía estructural de las proteínas. 125-128.
10. Aruoma, O. I. (1996). Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. 73: 1617-1625.
11. Badui Dergal, S. (2006). *Química de los alimentos*. Mexico: Alhambra Mexicana.

12. Barbana, C., & Boye, J. I. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. *Food Research International*, 43(6), 1642-1649.
13. Barbana, C., & Boye, J. I. (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chemistry*, 127(1), 94-101.
14. Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42 (2), 227-236.
15. Bernal, M. P., Clemente, R., & Walker, D. J. (2006). The role of organic amendment in the bioremediation of heavy metal polluted soils. In: Gore, R.W. (Ed.), *Environmental Research at the Leading Edge*. Nova Science, 1-60.
16. Betancur-Ancona, D., Gallegos-Tintore, S., Delgado-Herrera, A., Pérez-Flores, V., Ruelas, A. C., & Chel-Guerrero, L. (2008). Some physicochemical and antinutritional properties of raw flours and protein isolates from *Mucuna pruriens* (velvet bean) and *Canavalia ensiformis* (jack bean). *International Journal of Food Science and Technology*, 43(5), 816-823.
17. Betancur-Ancona, D., Martínez-Rosado, R., Corona-Cruz, A., Castellanos-Ruelas, A., Jaramillo-Flores, M. E., & Chel-Guerrero, L. (2009). Functional properties of hydrolysates from *Phaseolus lunatus* seeds. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(1), 128-137.
18. Betancur-Ancona, D., Sosa-Espinoza, T., Ruiz-Ruiz, J., Segura-Campos, M., & Chel-Guerrero, L. (2014). Enzymatic hydrolysis of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates and its effects on biological and functional properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(1), 2-8.
19. Bojórquez-Balam, E., Ruiz Ruiz, J., Segura-Campos, M., Betancur Ancona, D., & Chel Guerrero, L. (2013). Evaluación de la capacidad antimicrobiana de fracciones peptídicas de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero, & D. Betancur Ancona, *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (págs. 139-154). Barcelona: OmniaScience Monographs.

20. Braca A, Sortino C, Politi M, Morelli I, Mendez J (2002). Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *J. Ethnopharmacol.* 79(3):379-81.
21. Broughton , W. J., Hernandez , G., Blair, M., Beebe, S., Gepts , P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.). *Model food legumes. Plant and Soil*, 252, 55-128.
22. Brunner, B., Beaver, J., & Flores, L. (2011). *Mucuna*. Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales Estación Experimental de Lajas, Lajas, Puerto Rico.
23. Cai, F., Shen, P., Morgan, M., & Reynolds, E. (2003). Remineralization of enamel subsurface lesions in situ by sugar-free lozenges containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Australian Dental Journal* , 48 (4), 240-243.
24. Canseco, J. (2001). Caries dental. La enfermedad oculta. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*.
25. Cardador–Martínez, A.; Loarca–Piña, G. and Oomah, B. D. 2002. Antioxidant activity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *J. Agric. Food Chem.* 50:6975–6980.
26. Chel-Guerrero, L., Pérez-Flores, V., Betancur-Ancona, D., & Dávila-Ortiz, G. (2002). Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 584-591.
27. Chen, H.-M.; Muramoto, K.; and Yamauchi, F., and Nokihara, K. (1996). Antioxidant Activity of Designed Peptides Based on the Antioxidative Peptide Isolated from Digests of a Soybean Peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2619-2623.
28. Cho, J., Unklesbay, N., Hsieh, F., & Clarke, D. (2004). Hydrophobicity of Bitter Peptides from Soy Protein Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 52 (19), 5895-5901.
29. Clemente, A., Vioque, J., & Millán, F. (1999). Hidrolizados proteicos de origen vegetal. Departamento de Fisiología y Tecnología de Productos Vegetales. Instituto de la Grasa. 2 (6), 25-32.
30. Córdova-Lizama, A., Ruiz-Ruiz, J., Segura-Campos, M., Betancur-Ancona, D., & Chel-Guerrero, L. (2013). Actividad antitrombótica y anticariogénica de

- hidrolizados proteínicos de firjol lima (*Phaseolus lunatus*). En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero, & D. Betancur Ancona, *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (págs. 123-137). Barcelona: OmniaScience.
31. Corzo-Ríos, L., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2000). Extracción de las fracciones de almidón y proteína del grano de la leguminosa *Mucuna pruriens*. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 15(1), 37-41.
  32. Dávalos, A.; Miguel, M.; Bartolomé, B.; and López-Fandiño, R. (2004). Antioxidand Activity of Peptides Derived from Egg White Proteins by Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67(9): 1939-1944.
  33. De Luna, A. & Ponce, A. (1994). Evaluación de cinco leguminosas comestibles bajo dos sistemas de producción en dos años de estudio. *Investigación y Ciencia*. Pp. 6-8.
  34. Deshpande SS. (1992). Food legumes in human nutrition: A personal perspective. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32 (4): 333-363.
  35. Du, S. K., Jiang, H., Yu, X., & Jane, J. L. (2014). Physicochemical and functional properties of whole legume flour. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 308-313.
  36. González-Sánchez, A, Martínez-Naranjo, & T., Alfonz. (2009). Caries dental y factores de riesgo en adultos jóvenes. *Cubana Estomatol*, 46(3) 30-37.
  37. Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J., Valdez-Ortiz, A., Medina-Godoy, S. (2011). Potencial antioxidante y antihipertensivo de variedades de frijol cultivadas en el estado de Sinaloa. *XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería* 1.
  38. Guadix, A., Guadix, E., Páez-Dueñas, M., González-Tello, P., & Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica* , 41 (1), 79-89.
  39. Guerra-Almonacid, C. M., Murillo, W., Méndez, J. J. (2016). Antioxidant potential use of bioactive peptides derived from mung vean hydrolysates (*Vigna Radiata*). *African Journal of Food Science* 11(3), 67-73.
  40. Guzmán-Maldonado, S. H., Acosta-Gallegos, J., & Paredes-López , O. (2000). Protein characteristics and mineral contents of a novel collection of wild and weedy

- common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1874-1881.
41. Guzmán-Maldonado, S. H., Acosta-Gallegos, J. A., Álvarez-Muñoz, M. A., García-Delgado, S., Loarca-Piña, G. (2002). Calidad alimentaria y potencial nutraceutico del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) *Agricultura Técnica en México* 28(2), 159-173.
  42. Guzmán-Méndez, B., Jaramillo-Flores, M. E., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2014). Comparison of physicochemical properties, antioxidant and metal-chelating activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and hard-to-cook *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(8), 1859-1868.
  43. Hernández, C. M. Del C. A. (2003). Antigenotoxicidad del Aceite Esencial de *Matricaria chamamilla* Evaluada en Células somáticas y Germinales de Ratón. Tesis de Doctorado: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Pp. 17-18.
  44. Hernández-Ledesma, B., de Lumen, B., & Hsieh, C. (2013). 1997-2012: Fifteen Years of Research on Peptide Lunasin. En B. Hernández-Ledesma, & C. Hsieh, *Bioactive Food Peptides in Health and Disease* (págs. 3-22). Croatia: Publishing Process Manager.
  45. Herrera-Chalé, F. G., Ruiz-Ruiz, J. C., Acevedo-Fernández, J. J., Betancur-Ancona, D. A., & Segura-Campos, M. R. (2014). ACE inhibitory, hypotensive and antioxidant peptide fractions from from *Mucuna pruriens* proteins. *Process Biochemistry*, 49 (10), 1691–1698.
  46. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). (2014). Dirección de Prestaciones Médicas. Unidad de Atención Médica. División Institucional de Cuadros Básicos de Insumos para la Salud. 5:13-18.
  47. Iwaniak, A., & Minkiewicz, P. (2007). Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Acta Scientiarum. Polonorum Technologia Alimentaria*, 6 (3), 5-15.
  48. Juárez-Barrientos, J. M., Hernández-Santos, B., Herman-Lara, E., Martínez-Sánchez, C. E., Torruco-Uco, J. G., Ramírez-Rivera, E. J., Pineda-Pineda, J. M., Rodríguez-Miranda, J. (2017). Effects of boiling on the functional, thermal and

- compositional properties of the Mexican jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed Jackfruit seed meal properties. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(1), 1-9.
49. Kim (Lee), Y. S.; Park, W. S. P., y Rhee, C. K. (1990). Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3): 651-656.
  50. Kinsella, J. E. (1976). Functional properties of food proteins: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7, 219-280.
  51. Korhonen, H. (2002). Technology options for new nutritional concepts. *International Journal of Dairy Technology*, 55 (2), 79-88.
  52. Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16 (9), 945-960.
  53. Korhonen, H., Pihlanto-Lepälä, A., Rantamäki, P., & Tupasela, T. (1998). Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science and processing on bioactive proteins and peptides*, 9 (8-9), 307-319.
  54. Kuskoki, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 25(4), 726-732.
  55. Luna-Vital, D. A., Mojica, L., Mejía, E. G., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2014). Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Research International*. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.024>
  56. Marrufo-Estrada, D. M., Segura-Campos, M. R., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2013). Defatted *Jatropha curcas* flour and protein isolate as materials for protein hydrolysates with biological activity. *Food Chemistry*, 138(1), 77-83.
  57. Megías, C., Yust, M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., . . . Vioque, J. (2004). Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1928-1932.

58. Montgomery, D. C. (2007). *Diseño y análisis de experimentos*. México, D.F.: Limusa S.A. de C.V.
59. Mulero-Cánovas, J., Zafrilla-Rentero, P., Martínez-Cachá-Martínez, A., Leal-Hernández, M., & Abellán-Alemán, J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 23 (5), 219-227.
60. Muñoz Saldaña, R. (2010). Frijol, rica fuente de proteínas. *CONABIO. Biodiversitas*, 89, 7-11.
61. Murillo, F. E. (2006). Actividad Antioxidante *in vitro* de las Bebidas de Frutas. En: *Bebidas Mexicanas*, 15(3): 20-27. ISSN 0188-8080.
62. Ngatchic, J. T., Sokeng, S. D., Njintang, N. Y., Maoundombaye, T., Oben, J., & Mbofung, C. M. (2013). Evaluation of some selected blood parameters and histopathology of liver and kidney of rats fed protein-substituted mucuna flour and derived protein rich product. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 46-53.
63. Pedroche J., Yust M.M., Lqari H., Megias C., Giron-Calle J., Alaiz M., Millan F. (2007). Obtaining of brassica carinata protein hydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases. *Food Res, Int* 40, 931-938.
64. Pérez-Jiménez, J. (2007). Efecto de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos. *Universidad Autónoma de Madrid* 3-7.
65. Peña-Ramos, E. A., & Xiong, Y. L. (2002). Antioxidant Activity of Soy Protein Hydrolysates in a Liposomal System. *Journal of Food Science*, 67(8): 2952-2956.
66. Pihlanto-Lepälä A. (2000). *Trends Food Science Technology*. 11, 347-356.
67. Pihlanto A. & H Korhonen. (2003). Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food and Nutrition Research* 47, 175-276.
68. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. & Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26, 1231-1237.
69. Reynolds C. E. (1995). Dairy Products and Dental Health. *Proceedings of the Nutrition Society of Australia*, 19: 95-102.
70. Reynolds C. E. (1999). Anticariogenic Casein Phosphopeptides. *Protein and Peptide Letters*, 6: 295-303.

71. Rodríguez-Canto, W. J. (2014). Funcionalidad de dos sistemas hidrocoloides mixtos, de hidrolizados proteicos de *Phaseolus lunatus* y *Vigna unguiculata* con goma de framboyán (*Delonix regia*). *Universidad Autónoma de Yucatán* 38-54.
72. Román-Cortés, N., García-Mateos, M. R., Castillo-González, A. M., Sahagún-Castellanos, J., Jiménez-Arellanes, A. (2013). Componentes nutricionales y antioxidantes de dos especies de guaje (*Leucaena spp.*): un recurso ancestral subutilizado. *Universidad Autónoma de Chapingo* 167-168.
73. Ruíz-Ruíz, J., Dávila-Ortíz G., Betancur-Ancona D. (2005). Actividad antioxidante de fracciones peptídicas de hidrolizados proteínicos de frijol endurecido (*Phaseolus vulgaris* L.).
74. Ruiz-Ruiz, J., Segura Campos, M., Betancur Ancona, D., & Chel Guerrero, L. (2013a). Proteínas y péptidos biológicamente activos con potencial nutracéutico . En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero , & D. Betancur Ancona, *Biactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (págs. 11-27). Barcelona: OmniaScience.
75. Ruiz-Ruiz, J., Dávila-Ortíz, G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2013b). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant peptide fractions from hard-to-cook bean enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, 37(1), 26-35.
76. Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Vioque, J., Bautista, J., & Millán, F. (1999). Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*, 64(2), 237-243.
77. Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2013a). *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias*. Barcelona: OmniaScience.
78. Segura Campos, M. R., Chel Guerrero, L. A., & Betancur Ancona, D. A. (2010). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions extracted by ultrafiltration of cowpea *Vigna unguiculata* hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 90 (14), 2512-2518.
79. Shahidi F, & Zhong Y J . (2008). Bioactive peptides. *AOAC Int Jul-Aug*, 91(4), 914-31.

80. Sharma P, Kaul S, Dhar MK (2006). Can phaseolin patterns help resolve the Phaseolus-Vigna complex? *Genetic Resources and Crop Evolution*. 53: 1573-1578.
81. SIAP-SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México. (2000). *Situación actual y perspectiva de la producción de frijol en México, 1990-2000*.
82. Siddhuraju, P., & Becker, K. (2005). Nutritional and antinutritional composition, in vitro amino acid availability, starch digestibility and predicted glycemic index of differentially processed mucuna beans (*Mucuna pruriens* var. *utilis*): an under-utilised legume. *Food Chemistry*, 91(2), 275-286.
83. Sirtori, C. R., & Lovati, M. R. (2001). Soy proteins and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 3, 47-53.
84. Suetsuna, K., and Chen, J-R. (2002). *Note: Isolation and Characterization of Peptides with Antioxidant Activity Derived from Wheat Gluten*. *Food Science and Technology Research*, 8(3): 227-230.
85. Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* , 90, 1-11.
86. Torruco-Uco, J. G. (2009). Efecto antihipertensivo de fracciones peptídicas bioactivas obtenidas a partir de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y frijol jamapa (*Phaseolus vulgaris*). Tesis Doctoral. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
87. Torruco-Uco, J., Domínguez-Magaña, M., Dávila-Ortíz, G., Martínez-Ayala, A., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2008). Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* , 6 (2), 158-168.
88. Van der Plancken, I., Van Remoortere, M., Indrawati, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2003). Heat-Induced Changes in the Susceptibility of Egg White Proteins to Enzymatic Hydrolysis: a Kinetic Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 51 (13), 3819-3823.
89. Van der Ven, C., Gruppen, H., De Bont, A., & Voragen, J. (2002). Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and stabilizing ability of

- whey and casein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 50 (10), 2938-2946.
90. Vioque, J., Clemente, A., Bautista, J., & Millán, F. (2001). *Jornadas Internacionales sobre Proteínas Alimentarias*. Sevilla: Universidad de Sevilla, Secretariado de Publicaciones.
91. Vioque, J., & Millán, F. (2005). Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud.
92. Vioque, J., Pedroche, J., Yust, M., Lqari, H., Megías, C., Girón-Calle, J., y otros. (2006). Peptídeos bioativos em proteínas vegetais de reserva. *Brazilian Journal of Food Technology* , III JIPCA, 99-102.
93. Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M., & Millán, F. (2000). Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. *Grasas y Aceites* , 51 (5), 361-365.
94. Voet, D., Voet, J. G., & Pratt , C. W. (2007). Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. *Editorial médica Panamericana, Madrid*.
95. Wani, I. A., Sogi, D. S., Wani, A. A., & Gill, B. S. (2013). Physico-chemical and functional properties of flours from Indian kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *LWT-Food Science and Technology*, 53(1), 278-284.
96. Wani, I. A., Sogi, D. S., Shivhare, U. S., & Gill, B. S. (2014). Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates. *Food Research International*. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.027>
97. Wang Y., Barbieri L. R., Berg B. P. & McAllis T. A. (2007). Effects of mixing sainfoin with alfalfa on ensiling, ruminal fermentation and total tract digestion of silage. *Anim Feed Sci. Technol*, 135 (3-4), 296-314.
98. Warner, A. E., Kanekanian, D. A., and Andrews, T. A. (2001). Bioactivity of Milk Proteins: 1. Anticariogenicity of Whey Proteins. *International Journal of Dairy Technology*, 54(4): 151-153.
99. Were, L.; Hettiarachchy, S. N., and Kalapathy, U. (1997). Modified Soy Proteins with Improved Foaming and Water Hydration Properties. *Journal of Food Science*, 62(4): 821-824.

100. WHO. World Health Organization. (1999). International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *Journal of Hypertension* , 17, 151-183.
101. Zaragoza Castellanos Ramos, J., Guzmán-Maldonado, H., Muñoz-Ramos, J. J., Acosta-Gallegos, J. A. (2003). Flor de mayo Anita, nueva variedad de frijol para la región central de México. *Revista Fitotécnica Mexicana* 26(3), 209-211.
102. Zhang, S. B., Wang, Z., & Xu, S. Y. (2008). Antioxidant and Antithrombotic Activities of Rapeseed Peptides. *Journal of the American Oil Chemists' Society* , 85 (6), 521-527.