

Capítulo 6

Evaluación de la capacidad antimicrobiana de fracciones peptídicas de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*)

Erika Bojórquez Balam, Jorge Ruiz Ruiz, Maira Segura Campos, David Betancur Ancona, Luis Chel Guerrero

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

kaeri_gbb5@hotmail.com, jcruiz_ruiz@hotmail.com, maira.segura@uady.mx, bancona@uady.mx, cguerrer@uady.mx

Doi: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.96>

Referenciar este capítulo

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 (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 139-154). Barcelona: OmniaScience.

1. Introducción

Los agentes antimicrobianos han tenido gran relevancia desde hace más de 50 años en la industria alimentaria, donde han sido utilizados como aditivos tanto en alimentos procesados como en empaques, para evitar la generación de infecciones o intoxicaciones. Algunos ejemplos de estos son los derivados de los ácidos orgánicos, como los sorbatos, los propionatos y los benzoatos (Rodríguez & Schöbitz, 2009). Sin embargo, el uso irracional de estos compuestos ha generado una crisis de salud pública debido a la aparición de cepas resistentes a algunos antibióticos y antimicrobianos considerados como de mayor efectividad (Gutiérrez & Orduz, 2003). Por otra parte, la adición de agentes antimicrobianos a los alimentos debe de ser controlada, puesto que en concentraciones excesivas pueden ser tóxicas y/o modificar la estructura química de los diversos productos a los que es agregado (Zamudio, Bello, Vargas, Hernández & Romero, 2007; Davidson & Harrison, 2002). Esta situación ha dado lugar a una justificada alarma y a generado gran interés en el estudio y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos; como una alternativa a esta problemática se ha desarrollado una nueva generación de agentes antimicrobianos. En este sentido, los péptidos con actividad biológica tienen la capacidad de ejercer efectos específicos a nivel fisiológico en el organismo, como por ejemplo aquellos que presentan actividad antimicrobiana. Estas secuencias aminoácídicas son moléculas efectoras claves en la inmunidad innata, con tamaños que oscilan entre 2 hasta 200 aminoácidos (Rivas, Sada, Hernández & Tsutsumi, 2006). Diversos estudios han reportado que mediante la hidrólisis controlada *in vitro* de proteínas alimentarias es posible generar este tipo de péptidos. Se han aislado péptidos antimicrobianos principalmente a partir de hidrolizados enzimáticos limitados, de proteínas de origen animal como la leche, el huevo y algunas especies marinas de peces. Recientemente se han aislado de hidrolizados limitados, con grados de hidrólisis menor al 10%, de proteínas de origen vegetal como la soya y el maíz (Dubin, Mak, Dubin, Rzychon, Stec, Wladyka et al., 2005). México posee una amplia diversidad de recursos naturales con potencial para la obtención y aislamiento de compuestos fisiológicamente activos conocidos como nutraceuticos. Tales compuestos tienen aplicación en el desarrollo de alimentos de tipo funcional, como es el caso de los péptidos con actividad biológica (Lajolo, 2002). Entre los recursos vegetales empleados para la alimentación, destacan las leguminosas debido a que son la principal forma de obtención de proteínas de estratos socioeconómicos que tienen limitado acceso a proteínas de origen animal, debido a su alto costo de producción y comercialización (SAGARPA, 2000). En Yucatán, México, sobresale el frijol lima (*Phaseolus lunatus*), debido a que presenta un alto contenido de proteína (29%) (Bartholomai, Tosi & González, 2000). Sin embargo este frijol es un cultivo no tecnificado, es decir que su producción depende de las condiciones climáticas, por lo que se le puede considerar una fuente de proteína subutilizada (Betancur-Ancona, Gallegos-Tintoré & Chel-Guerrero, 2004). Tomando en consideración lo anterior, la leguminosa *Phaseolus lunatus* puede plantearse como una opción para la obtención de productos con un alto contenido de proteína, como los concentrados proteínicos, a partir de los cuales se podrían generar vía modificación enzimática *in vitro*, péptidos con actividad biológica, con potencial para ser empleados como ingredientes nutraceuticos o como aditivos en el desarrollo de sistemas alimentarios.

2. Materiales y métodos

2.1. Obtención de la harina del frijol lima

Se emplearon granos de *P. lunatus* provenientes de la cosecha 2012 del estado de Yucatán, México. Los granos se limpiaron y se seleccionaron los que no presentaron ningún tipo de daño físico para molerlos. La harina obtenida se tamizó a través de mallas tamaño 80 (0.177 mm) y 100 (0.149 mm) hasta obtener una harina con partículas menores a 0.149 mm.

2.2. Obtención del concentrado proteínico del frijol lima

Se empleó el método reportado por Betancur-Ancona et al. (2004). A una dispersión de harina:agua (relación 1:6 p/v) se le ajustó el pH a 11. La dispersión se agitó por 1 h a 400 rpm, se filtró a través de tamices de malla 80 y 100 para eliminar la fibra. El residuo sólido se lavó cinco veces con agua destilada (1:3, p/v), recuperando y mezclando el agua de lavado con la suspensión. Se dejó reposar por 1 h para precipitar el almidón. El sobrenadante (proteína) se decantó y se ajustó el pH a 4.5 (PI), la solución se centrifugó a 4500 rpm por 30 min. El precipitado se secó a -47°C y 13×10^{-3} mbar en una liofilizadora.

2.3. Composición proximal de la harina y el concentrado proteínico del frijol lima

Se emplearon los métodos de la AOAC (1997): Humedad (Método 925.09) secado a 105°C hasta peso constante. Cenizas (Método 923.03), residuo inorgánico resultante de la incineración a 550°C . Grasa cruda (Método 920.39), lípidos libres extraídos con hexano. Proteína cruda (Método 954.01), por el método Kjeldahl, usando 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína. Fibra cruda (Método 962.09), residuo orgánico combustible e insoluble que se obtiene después de que la muestra fue sometida a una digestión ácida y alcalina. Extracto libre de nitrógeno (ELN), se calculó por diferencia.

2.4. Hidrólisis del concentrado proteínico

La hidrólisis se efectuó empleando las enzimas pepsina y pancreatina, de manera independiente y secuencial. La hidrólisis se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Megías, Yust, Pedroche, Lquari, Girón-Calle, Alaiz et al. (2004), la digestión con pepsina se realizó durante 10 min, usando una concentración de sustrato del 4%, una relación enzima/sustrato 1/10, a una temperatura de 37°C y un pH de 2. La digestión con pancreatina fue durante 10 min, usando una concentración de sustrato del 4%, una relación enzima/sustrato 1/10, y la temperatura de 37°C a un pH de 7.5. La hidrólisis con el sistema enzimático secuencial pepsina-pancreatina, se llevó a cabo de acuerdo con el método propuesto por Vioque, Megías, Yust, Pedroche, Lquari, Girón-Calle et al. (2004). El tiempo de total reacción fue de 10 min, la primera digestión se efectuó con pepsina hasta la mitad del tiempo (5 min) usando una concentración de sustrato del 4%, una relación enzima/sustrato 1/10, a una temperatura de 37°C y un pH de 2. La segunda digestión se realizó añadiendo enzima pancreatina, a la misma temperatura, relación enzima/sustrato y tiempo, modificando el pH a 7.5. La hidrólisis se efectuó en un vaso de precipitado de 2000 mL colocado en un baño de agua, la agitación se efectuó con agitador mecánico (Caframo RZ-1) a 300 rpm, se empleó un termómetro para controlar la temperatura y un electrodo para ajustar el pH. Se empleó como sustrato una solución de proteína al 4% (p/v),

preparada disolviendo 56.72 g de concentrado proteínico de frijol lima (b.s.) en 1 L de agua destilada. La hidrólisis se detuvo colocando las muestras en un baño de agua a 80 °C durante 20 min, finalmente se centrifugaron a 10,000 x g por 20 min usando una centrifuga Beckman, la porción soluble se conservó en congelación.

2.5. Determinación del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) se determinó con la técnica propuesta por Nielsen, Petersen y Dammann (2001). Inicialmente, se preparó una solución de L-serina en agua destilada (1.004 mg/mL) para obtener una curva de calibración. Las absorbancias fueron empleadas para hallar los equivalentes de aminos liberados por la hidrólisis. Se utilizó la ecuación de la recta de calibración y se aplicó la siguiente fórmula: $\%GH = (h/h_{tot}) \times 100$. Dónde:

h = concentración de grupos aminos libres expresada como meq/g de proteína.

h_{tot} = número total de enlaces peptídicos presentes en las proteínas de *P. lunatus*. 4.9.

2.6. Obtención de las fracciones peptídicas por ultrafiltración

La porción soluble del hidrolizado fue ultrafiltrada empleando la metodología propuesta por Cho, Unklesbay, Hsieh y Clarke (2004). Se obtuvieron dos fracciones utilizando una membrana con un corte de peso molecular de 10 kDa. Colectando de manera separada el retenido y el permeado. Las fracciones se denominaron como: > 10 kDa y < 10 kDa.

2.7. Cromatografía de filtración en gel

Se empleó la metodología propuesta por Vioque et al. (2004). Se empleó una columna de filtración (3 cm x 80 cm) Sephadex G- 50 en la cual se inyectaron 10 mL de la fracción peptídica que presentó la mayor actividad antimicrobiana en una solución de bicarbonato de amonio 50 mM (pH 9.1), con un flujo de 10 mL/h. Las masas moleculares de los diferentes péptidos se determinaron con curvas de calibración que se obtuvieron con estándares de pesos moleculares conocidos: tiroglobulina bovina (670 kDa), globulina bovina (158 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), mioglobina equina (17 kDa) y vitamina B12 (1.35 kDa). El perfil de elución se monitoreó a 280 nm.

2.8. Determinación cuantitativa de proteína

Al hidrolizado y a las fracciones obtenidas por ultrafiltración se les determinó el contenido de proteína mediante el método de Lowry, Rosebrough, Farr y Randall (1951). A las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel se les determinó el contenido de proteína mediante la metodología propuesta por Bradford (1976).

2.9. Actividad antimicrobiana

Determinación espectrofotométrica de la inhibición del crecimiento bacteriano

Los cultivos de *S. aureus* y *S. flexneri* fueron ajustados a una concentración de 1×10^6 ufc/mL de acuerdo a la escala de McFarland, utilizando caldo nutritivo. Se determinó la actividad antimicrobiana del hidrolizado y sus fracciones empleando el método propuesto por Christman (2010). Se colocaron 1.5 mL del caldo inoculado en tubos de ensayo, se prepararon soluciones del hidrolizado y sus fracciones a 100, 50 y 2% con agua destilada estéril y se adicionaron 1.5 mL de estas soluciones a los tubos de ensayo con caldo inoculado, se agitaron en vortex durante 5 s. La concentración final de fracción fue de 50, 25 y 1%. La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 625 nm a los tiempos de 0, 2, 4, 8, 12 y 24 h.

Inhibición del crecimiento bacteriano por el método de dilución en agar

Se empleó el método reportado por Vaca-Ruiz, Silva y Laciari (2009), se prepararon cajas Petri con agar Muller-Hinton y se adicionó la cantidad requerida de las muestras a evaluar, hasta lograr proporciones de 50 y 25%. El control positivo fue nisina a una concentración de 20 mg/mL, un péptido antimicrobiano reconocido como seguro por la FDA y el control negativo agua destilada estéril. Posteriormente se realizó una siembra masiva con 10 μ L de los microorganismos *S. aureus* y *S. flexneri* a una concentración de 1×10^6 ufc/mL. Se dejaron incubar durante 24 h a 37°C.

2.9.3. Mínima Concentración Inhibitoria

Se empleó la metodología propuesta por Vaca-Ruiz et al. (2009), utilizando microplacas de 96 pocillos los cuales fueron llenados de acuerdo al esquema presentado en la Figura 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													<i>S. aureus</i>
B													
C													
D	3	2	1							1	2	3	Controles
E	3	2	1							1	2	3	Controles
F													
G													<i>S. flexneri</i>
H													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Figura 1. Esquema de llenado de los pocillos de la microplaca (Vaca-Ruiz et al., 2009)

A los pocillos marcados con el número 1, se adicionaron 100 μ L de caldo nutritivo inoculado con la bacteria a evaluar a una concentración de 1×10^6 ufc/mL. A los pozos marcados con el número 2 se procedió como en 1 más 100 μ L de nisina a una concentración de 20 mg/mL (control -). A los pozos marcados con el número 3 también se procedió como en 1 y se agregaron 100 μ L de agua destilada estéril (control +). Se adicionaron 150 μ L de caldo nutritivo inoculado con la bacteria a evaluar en cada uno de los pocillos de las filas A y B para *S. aureus*, y G y H para *S. flexneri*.

Después se adicionaron 50 µL de muestra en las siguientes concentraciones: 100, 96, 90, 86, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 y 10%. Las microplacas se incubaron a 37°C por 24 h. Finalmente se preparó una solución de cloruro de trifeniltetrazolio al 2% en agua destilada estéril y se adicionaron 100 µL a cada pocillo de prueba. Una coloración roja indicó la presencia de células viables.

3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la caracterización proximal de la harina y el concentrado proteínico de *P. lunatus*., de la hidrólisis del concentrado proteínico y de la actividad antimicrobiana, fueron evaluados mediante análisis de varianza de una vía y comparación de medias por la mínima diferencia significativa (MDS) para establecer las diferencias entre tratamientos. Se empleó el paquete computacional Statgraphics Plus Versión 5.1 de acuerdo a métodos señalados por Montgomery (2003).

4. Resultados y discusión

4.1. Composición proximal de la harina y concentrado proteínico de *P. lunatus*

La composición proximal de la harina y el concentrado proteínico de frijol lima se presenta en el cuadro 1. En cuanto a la humedad, el concentrado presentó un mayor contenido comparado con la harina, debido a que en la etapa final de la obtención de la harina se calienta a 60 °C antes de tamizar, reduciéndose así el contenido de humedad. El contenido de proteína cruda de la harina (19.6%) fue similar al 21.7% para *Phaseolus vulgaris* (Ruiz-Ruiz, Dávila-Ortíz, Chel-Guerrero & Betancur-Ancona, 2012). El contenido de proteína del concentrado fue de 67.5%, valor semejante al reportado por Tello, Ruiz, Chel y Betancur (2010), de 67.3% para un concentrado de *P. lunatus* y al obtenido por Ruiz-Ruiz *et al.* (2012), en concentrados de *P. vulgaris* (67.7%). El contenido de grasa (2.92%) en el concentrado fue similar (3.12%) al reportado por Tello *et al.* (2010) y mayor (0.68%) al exhibido por Betancur-Ancona *et al.* (2004). El incremento de grasa cruda en el concentrado proteínico, pudo deberse a que durante la extracción alcalina de la proteína (pH 11) se saponifican las grasas de carácter polar, precipitando con la proteína al modificar el punto isoeléctrico (pH 4.5), tal como lo observaron Chel, Pérez, Betancur y Dávila (2002), en concentrados de *Canavalia ensiformis* y *Phaseolus lunatus*.

Componente (%)	Harina	Concentrado proteínico
Humedad	4.75 ^a	5.18 ^a
Cenizas	2.70 ^a	4.62 ^b
Proteína	19.60 ^a	67.52 ^b
Fibra	2.38 ^b	0.57 ^a
Grasa	1.06 ^a	2.92 ^b
ELN	74.26 ^b	24.35 ^a

Tabla 1. Composición proximal de la harina y el concentrado proteínico de *P. lunatus* (% B.S.). Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

Los contenidos de fibra cruda y ELN disminuyeron, en un 75.7% y 67.2%, respectivamente, esto se debió a que el proceso de obtención del concentrado incluye etapas específicas de separación de estos componentes. Lo anterior resulta conveniente ya que de acuerdo con Ruiz-Ruiz et al. (2012), los componentes no proteicos como lípidos, fibra, hidratos de carbono y componentes menores como sustancias minerales afectan la calidad final del concentrado.

4.2. Hidrólisis del concentrado proteínico de *P. lunatus*

Los grados de hidrólisis (GH) de los hidrolizados obtenidos con pepsina, pancreatina y pepsina-pancreatina se presentan en la Figura 2, el cual osciló entre 5.5% y 8.3%, por lo que se puede considerar a los hidrolizados como limitados, con un grado de hidrólisis menor al 10%. La diferencia en el GH se debe a que las enzimas presentan diferente actividad catalítica. La pepsina es la principal enzima gástrica que degrada las proteínas en el estómago durante la digestión, tiene actividad endopeptidasa, hidrolizando preferentemente por el extremo C-terminal de los residuos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano. Su acción rompe las cadenas de polipéptidos en secciones más cortas, es decir que mediante su acción se producen aminoácidos libres pero la mayoría de los productos son oligopéptidos. Por otra parte, la pancreatina incluye proteasas como tripsina, quimotripsina y elastasa. Tripsina, quimotripsina y elastasa son serinoproteasas, con actividad de endopeptidasas ya que hidrolizan enlaces internos de los péptidos. La hidrólisis con pancreatina resulta en una mezcla de pequeños oligopéptidos (60-70%) y aminoácidos libres (30-40%), que son absorbidos a lo largo del intestino delgado (Sewald & Jakubke, 2002).

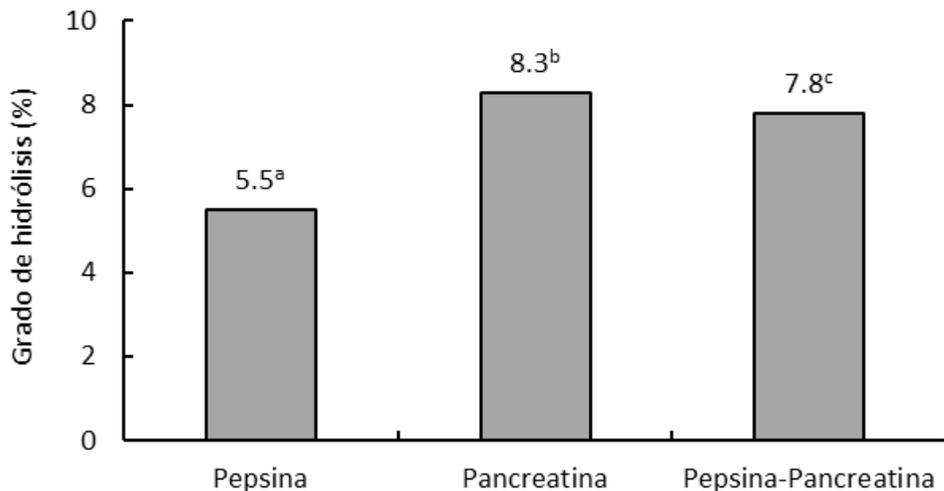


Figura 2. Porcentaje de grado de hidrólisis de los hidrolizados proteínicos de *P. lunatus* obtenidos con pepsina, pancreatina y pepsina-pancreatina. Letras diferentes en la misma serie indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

Si bien el uso secuencial de proteasas con diferente o igual actividad catalítica permite la obtención de hidrolizados proteínicos con altos grados de hidrólisis, en el caso del sistema

secuencial pepsina-pancreatina, el corto tiempo de reacción no permitió la generación de un mayor grado de hidrólisis. De acuerdo con Christman (2010), a menor grado de hidrólisis suele obtenerse mayor actividad antimicrobiana, ya que se generan péptidos de mayor peso molecular. Considerando lo anterior se seleccionó el hidrolizado obtenido con pepsina, ya que presentó el menor grado de hidrólisis (5.5%).

4.3. Separación de las fracciones peptídicas por ultrafiltración

El hidrolizado fue fraccionado de acuerdo a su peso molecular utilizando la ultrafiltración, generándose dos fracciones una mayor a 10 kDa (> 10 kDa) y una menor a 10 kDa (< 10 kDa). Se determinó el contenido de proteína, observándose que disminuyó de manera proporcional al peso molecular de las fracciones, la mayor cantidad de proteína se observó en el hidrolizado y la menor en la fracción de < 10 kDa (Figura 3). La ultrafiltración se empleó debido a que los péptidos con actividad antimicrobiana generalmente presentan un peso molecular cercano a 10 kDa (Rivillas & Soriano, 2006).

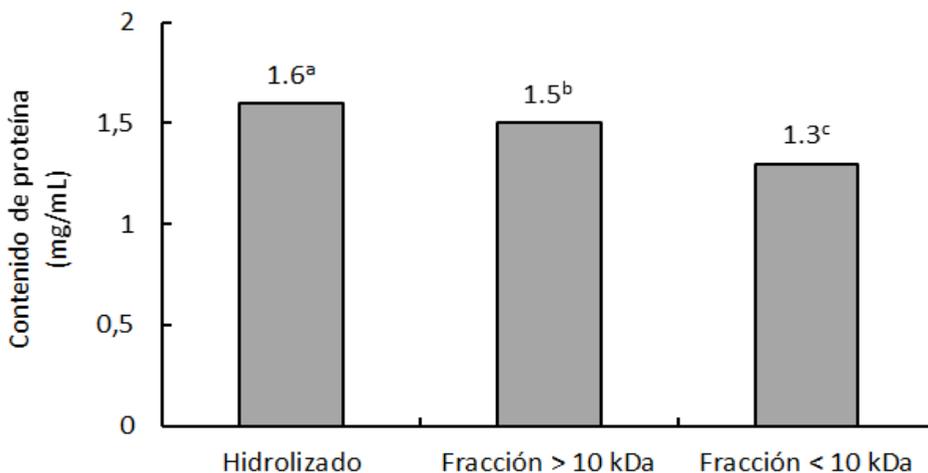


Figura 3. Contenido de proteína del hidrolizado de *P. lunatus* y sus fracciones peptídicas. Letras diferentes en la misma serie indican diferencias estadística significativa ($p < 0.05$)

4.4. Actividad antimicrobiana

Determinación espectrofotométrica de la inhibición del crecimiento bacteriano

Se determinó el efecto del hidrolizado y sus fracciones en el crecimiento de los microorganismos. Como se observa en la Figura 4, el hidrolizado disminuyó el crecimiento de ambos microorganismos, ya que las absorbancias obtenidas fueron menores a las del control negativo (crecimiento normal). Los mejores resultados en cuanto a la inhibición del crecimiento se obtuvieron a las concentraciones de 25% y 50%, cuyos patrones de inhibición fueron iguales o menores al del control positivo (inhibición con nisina). Para las fracciones > 10 kDa y < 10 kDa se obtuvo un comportamiento semejante al que presentó el hidrolizado, las mayores inhibiciones del crecimiento se obtuvieron a las concentraciones de 25% y 50% (Figura 4). Resultados

semejantes fueron obtenidos por Christman (2010) para proteínas de caseína hidrolizadas con pepsina, en donde los resultados más favorables se obtuvieron a concentraciones de 30 y 50% de estos hidrolizados frente a *E. coli* O177:H7.

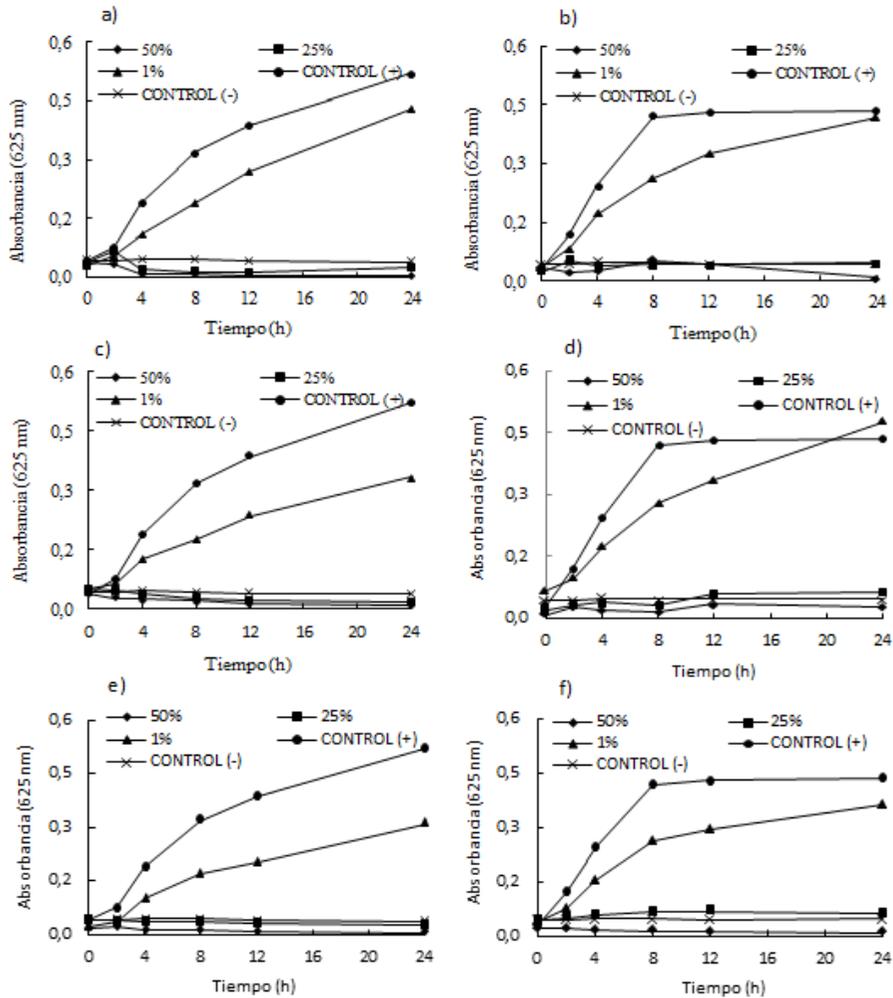


Figura 4. Determinación espectrofotométrica de la Inhibición del crecimiento bacteriano. Efecto del hidrolizado de *P. lunatus* sobre a) *S. aureus* y b) *S. flexneri*, de la fracción > 10 kDa sobre c) *S. aureus* y d) *S. flexneri*, y de la fracción < 10 kDa sobre e) *S. aureus* y f) *S. flexneri*, a diferentes concentraciones 1, 25 y 50%. Control negativo (agua destilada estéril) y control positivo (nisina 20 mg/mL)

De igual manera Ayob, Nee, San, Leong y Osmar (2009) comprobaron que al aplicar la ultrafiltración se obtienen fracciones peptídicas con mayor actividad antimicrobiana como ocurrió con los hidrolizados de palma contra el *Bacillus cereus*. El comportamiento del hidrolizado y sus fracciones, en cuanto a la inhibición del crecimiento bacteriano, probablemente se debió a la presencia de péptidos con actividad antimicrobiana, generados durante la hidrólisis.

No obstante, en el hidrolizado y en la fracción > 10 kDa, podrían haber otros componentes como proteínas sin hidrolizar y carbohidratos, que actuarían como fuente de alimento para los microorganismos. Con base a esto se considera que la mejor alternativa para obtener PAM es la fracción < 10 kDa a las concentraciones de 25% y 50%, pues tiene mayor pureza y esto facilitaría el aislamiento de los péptidos.

Inhibición del crecimiento bacteriano por el método de dilución en agar

A la concentración de 25% la fracción de < 10 kDa redujo de forma limitada el crecimiento de *S. aureus* y no tuvo ningún efecto sobre *S. flexneri*, observándose un crecimiento masivo (Figura 5). Por el contrario a la concentración de 50%, la fracción inhibió el crecimiento de ambos microorganismos. De acuerdo con Denisson, Wallace, Harris y Phoenix (2005), el efecto antimicrobiano de un hidrolizado o una fracción peptídica se debe a las características de los péptidos presentes, tales como secuencia aminoacídica, hidrofobicidad y carga neta. Otro factor que también influye es la composición de la membrana celular del microorganismo, ya que esta no es la misma para las bacterias Gram positivas (como *S. aureus*) y las Gram negativas (como *S. flexneri*).

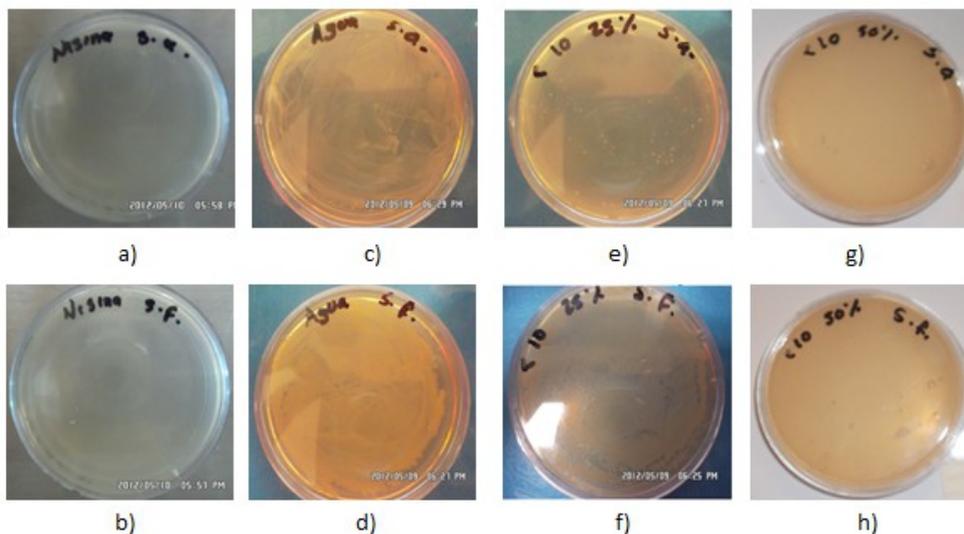


Figura 5. Inhibición del crecimiento bacteriano por el método de dilución en agar.
a) Control negativo *S. aureus*, b) Control negativo *S. flexneri*, c) Control positivo *S. aureus*, d) Control positivo *S. flexneri*, e) Fracción < 10 KDa (25%) contra *S. aureus*, f) Fracción < 10 KDa (25%) contra *S. flexneri*, g) Fracción < 10 KDa (50%) contra *S. aureus*, h) Fracción < 10 KDa (50%) contra *S. flexneri*

Mínima Concentración Inhibitoria

En la Figura 6 se muestran los resultados de la determinación de la mínima concentración inhibitoria de la fracción de < 10 KDa, empleando cloruro de trifeniltetrazolio como indicador de

la viabilidad de las células bacterianas. Las zonas de color rojo son indicativas de que las células bacterianas se encontraban viables y no fueron afectadas por la concentración de la fracción de < 10 KDa.

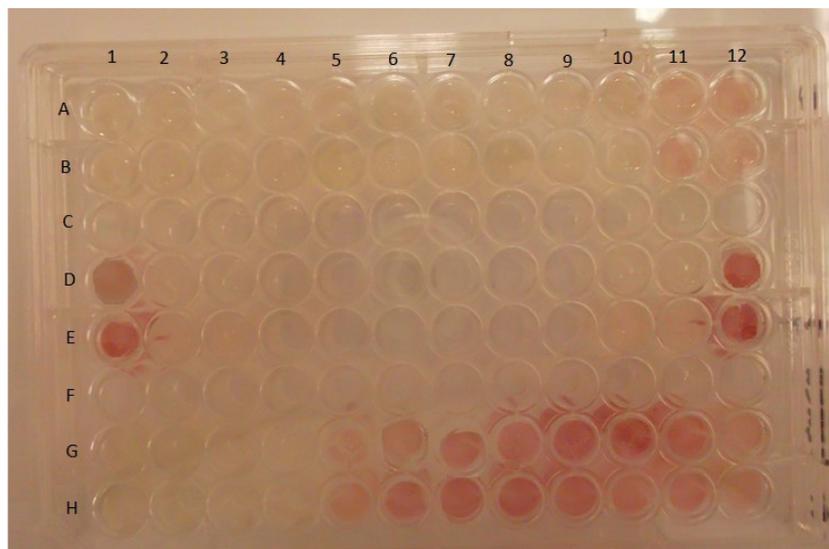


Figura 6. Determinación de la mínima concentración inhibitoria de la fracción de < 10 KDa, capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* y *S. flexneri*. Las columnas 1 a 12 corresponden a las concentraciones de la fracción < 10 kDa de: 100, 96, 90, 86, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 y 10%. Filas A y B inhibición de *S. aureus*, filas G y H inhibición de *S. flexneri*. Los pozos 1D, 12D, 1E y 12E (control positivo), los pozos 2D, 11D, 2E y 11E (control negativo)

La mínima concentración inhibitoria de la fracción de < 10 KDa para *S. aureus* fue de 392.04 μg de proteína/mL. En tanto que la mínima concentración inhibitoria de la fracción de < 10 KDa para *S. flexneri* de 993.17 μg de proteína/mL. La mínima concentración inhibitoria que presentó la fracción de < 10 KDa del hidrolizado de *P. lunatus*, fue menor a la reportada por Ayob et al. (2009) de 2400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra *Bacillus cereus*, para una fracción de < 10 KDa obtenida a partir de la hidrólisis con pepsina del residuo proteínico de la palma *Elaeis guineensis*.

5. Cromatografía de filtración en gel

La fracción peptídica de < 10 kDa obtenida por ultrafiltración del hidrolizado de *P. lunatus*, presentó la mayor actividad antimicrobiana contra los dos microorganismos evaluados. Por lo que los péptidos que la constituyen fueron separados y purificados de acuerdo a su tamaño molecular. Los cromatogramas obtenidos de los estándares de peso molecular y de la fracción peptídica de < 10 kDa se presentan en la Figura 7. El cromatograma se dividió en 6 secciones de acuerdo al tamaño molecular de los estándares empleados: SI = > 670 kDa, SII = 158-670 kDa, SIII = 44-158 kDa, SIV = 17-44 kDa, SV = 1.35-17 kDa, SVI = < 1.35 kDa. En el perfil cromatográfico de la fracción < 10 kDa (Figura 7), se observan tres conjuntos de péptidos distribuidos entre las secciones III, V y VI. De acuerdo con las curvas de calibración que se obtuvieron con los

estándares de peso molecular conocido, los picos mayoritarios estarían constituidos por péptidos con pesos moleculares de 0.82 kDa (Sección VI), 5.8 kDa (sección V), y 179 kDa (Sección III), que corresponderían a secuencias de 4, 28 y 880 residuos aminoacídicos, respectivamente.

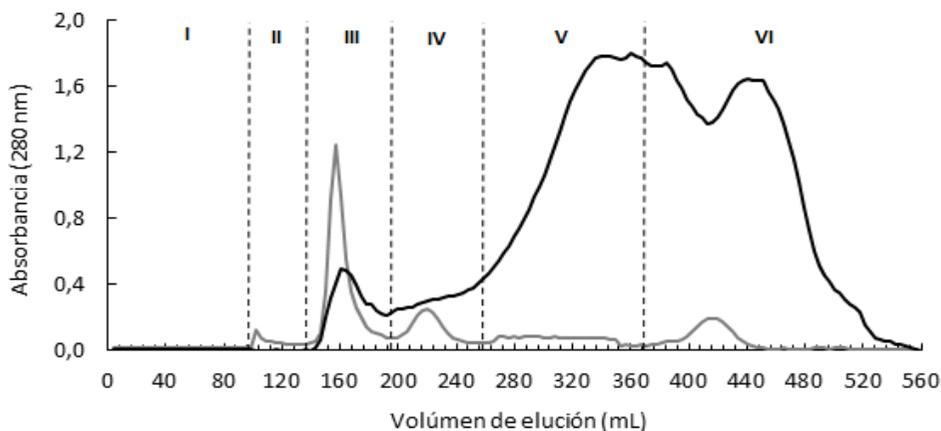


Figura 7. Perfil cromatográfico de filtración en gel (columna Sephadex G-50) de la fracción de < 10 kDa obtenida por ultrafiltración del hidrolizado proteínico de *P. lunatus*. (—) Fracción < 10 kDa. (---) Estándares de peso molecular

Para evaluar la actividad antimicrobiana de la fracción peptídica de < 10 kDa se agruparon los conjuntos de péptidos distribuidos en las secciones SV y SVI en 6 fracciones peptídicas, cuyos rangos de volumen de elución fueron los siguientes: F1 = 276-308 mL, F2 = 311-343 mL, F3 = 346-378 mL, F4 = 381-413 mL, F5 = 416-448 mL, F6 = 451-483 mL. Las fracciones con volúmenes de elución menores y mayores a 276 mL y 483 mL, no fueron analizadas por corresponder a polipéptidos de alto peso molecular y aminoácidos libres, los cuales no se caracterizan por presentar actividad antimicrobiana. Para las fracciones obtenidas por cromatografía de gel, el contenido de proteína osciló entre 351.41 y 1582 µg/mL (Tabla 2) con F5 presentando el mayor contenido de proteína y F1 el menor.

Fracción	Concentración de proteína (mg/mL)
1	351.18 ^a
2	375.21 ^b
3	398.91 ^c
4	1402.54 ^e
5	1582.53 ^f
6	617.91 ^d

Tabla 2. Contenido de proteína de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel. Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

De las seis fracciones peptídicas obtenidas por filtración en gel, solamente la fracción 6 inhibió el crecimiento de los microorganismos evaluados (Figura 8).

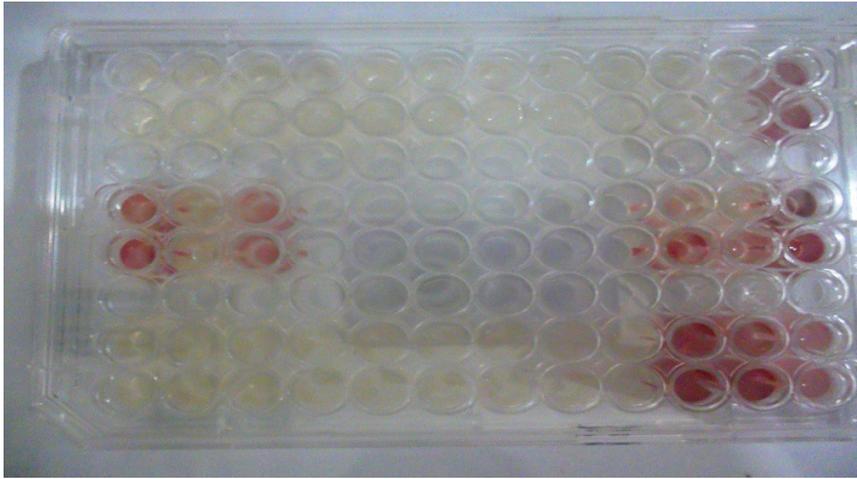


Figura 8. Determinación de la mínima concentración inhibitoria de la fracción 6 obtenida por cromatografía de filtración en gel. Las columnas 1 a 12 corresponden a las concentraciones de la fracción 6 de: 100, 96, 90, 86, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 y 10%. Filas A y B inhibición de *S. aureus*, filas G y H inhibición de *S. flexneri*. Los pozos 1D, 12D, 1E y 12E (control positivo), los pozos 2D, 11D, 2E y 11E (control negativo)

La mínima concentración inhibitoria (MCI) de la fracción 6 para *S. aureus* fue de 61.79 μg de proteína/mL. En tanto que la mínima concentración inhibitoria para *S. flexneri* fue de 185.37 μg de proteína/mL. En ambos casos la mínima concentración inhibitoria disminuyó, indicando que la separación y purificación por cromatografía de filtración en gel permitió obtener la fracción cuyos péptidos, son los responsables de la actividad antimicrobiana observada tanto en el hidrolizado como en las fracciones peptídicas ultrafiltradas. Para el caso de *S. aureus*, la MCI disminuyó 6.3 veces y para *S. flexneri* la MIC disminuyó 5.3 veces.

6. Conclusiones

El concentrado proteínico de *P. lunatus* fue adecuado para generar hidrolizados limitados vía hidrólisis enzimática *in vitro*, empleando las enzimas pepsina y pancreatina, y el sistema enzimático secuencial pepsina-pancreatina. El menor grado de hidrólisis se obtuvo con pepsina (5.5%). La porción soluble del hidrolizado se fraccionó empleando una celda de ultrafiltración, generando dos fracciones una > 10 kDa y una < 10 kDa. El hidrolizado y las fracciones peptídicas, presentaron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *S. flexneri*. La mayor actividad antimicrobiana la presentó la fracción < 10 kDa con una mínima concentración inhibitoria de 392.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra *S. aureus* y 993.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra *S. flexneri*. Los resultados permiten plantear el potencial uso de los hidrolizados y las fracciones peptídicas de *P. lunatus* para la obtención de péptidos antimicrobianos, los cuales pueden emplearse como aditivos de origen

natural, los cuales presentan la ventaja de no desarrollar mecanismos de inmunidad en los microorganismos.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo al proyecto de ciencia básica titulado "Actividad biológica de fracciones peptídicas derivadas de la hidrólisis enzimática de proteínas de frijoles lima (*Phaseolus lunatus*) y caupí (*Vigna unguiculata*)". Con número de convenio 153012), del cual forma parte este trabajo.

Referencias

AOAC (1997). *Official Methods of analysis. Association of official analytical chemists*, 15th ed., Ed. William Horwitz, Washington, D.C., USA.

Ayob, M.K., Nee, T.Y., San, T.K., Leong, C.K., & Osmar, A.M.D. (2009). Antimicrobial effects of palm kernel cake protein hidrolysates. *Prosiding Seminar kimia Bersama UKM-ITB VIII*, 1-13.

Bartholomai, G.B., Tosi, E., & González, R. (2000). *Caracterización de compuestos nutritivos, no nutritivos y calidad proteica*. 1ª ed., Programa iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

Betancur-Ancona, D., Gallegos-Tintoré, S., & Chel-Guerrero, L. (2004). Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(10), 1193-1201.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 24248-24254.

Chel, L., Pérez, V., Betancur, D., & Dávila, G. (2002). Functional Properties of Flours and Protein Isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50(3), 584-591.

Cho, M.J., Unklesbay, N., Hsieh, F., & Clarke, A.D. (2004). Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5895-5901. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0495035>

Christman, J. (2010). Antimicrobial activity of casein hidrolizates against *Listeria monocytogene* and *Escherichia coli* O157:H7. Master's thesis, University of Tennessee, 42-62.

Davidson, P.M., & Harrison, M.A. (2002). Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers and other. *Food Technology*, 56(11), 69-78.

- Denisson, S., Wallace, J., Harris, F., & Phoenix, D. (2005). Amphiphilic α -helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships. *Protein and Peptide Letters*, *12*(1), 31-39.
- Dubin, A., Mak, P., Dubin, G., Rzychon, M., Stec, J., Wladyka, B., Maziarka, K., & Chmiel, D. (2005). New generation of peptide antibiotics. *Acta Biochimica Polonica*, *52*(3), 633-638.
- Gutiérrez, P.B., & Orduz, S. (2003). Péptidos antimicrobianos: estructura, función y aplicaciones. *Actualidades Biológicas*, *25*, 5-15.
- Lajolo, F.M. (2002). Functional foods: Latin American perspectives. *British Journal of Nutrition*, *88*(2), S145-S150.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biology Chemistry*, *193*, 267-275.
- Megías, C., Yust, M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & 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*, 1928-1932.
- Montgomery, D. (2005). Diseño y análisis de experimentos. 2ª ed., México, Limusa Willey, 100-102.
- Nielsen, P., Petersen, D., & Dammann, C. (2001). Improved method for determine food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, *66*, 642-648. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>
- Rivas, B., Sada, E., Hernández, R., & Tsutsumi, V. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de las enfermedades infecciosas. *Salud Pública de México*, *48*, 62-71.
- Rivillas, L., & Soriano, M. (2006). Antimicrobial peptides from plants as mechanism of defense. *Actual Biology*, *28*(85), 155-169.
- Rodríguez, D., & Schöbitz R. (2009). Película antimicrobiana a base de proteína de suero lácteo, incorporada con bacterias lácticas como controlador de *Listeria monocytogenes*, aplicada sobre salmón ahumado. *Revista Biotecnológica en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *7*(2), 49-54. Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias.
- Ruiz-Ruiz, J.C., Dávila-Ortíz, G., Chel-Guerrero, L.A., & Betancur-Ancona, D.A. (2012). Wet fractionation of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds and characterization of protein, starch and fibre fractions. *Food Bioprocess and Technology*, *5*, 1531-1540.
- 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*.
- Sewald, N., & Jakubke, H.D. (2002). *Peptides: Chemistry and Biology*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, Verlag GmbH, 590. <http://dx.doi.org/10.1002/352760068X>

Tello, R, Ruiz, J., Chel, L., & Betancur, D. (2010). Funcionalidad biológica de jugo de naranja incorporado con hidrolizado proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). En: *Utilización de recursos naturales tropicales para el desarrollo de alimentos*. Ed. UADY, Mérida, Yucatán, México, 233-238.

Vaca-Ruiz, M.L., Silva, P.G., & Laciari, A.L. (2009). Comparison of microplate, agar drop and well diffusion plate methods for evaluating hemolytic activity of *Listeria monocytogenes*. *African Journal of Microbiology Research*, 3(6), 319-324.

Vioque, J., Megías, C., Yust, M.M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., & Millán, F. (2004). Purification of an ACE Inhibitory Peptide alters Hydrolysis of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Protein Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (52), 1928-1932.

Zamudio, P.B., Bello, L.A., Vargas, A., Hernández, J.P., & Romero, C.A. (2007). Caracterización parcial de películas preparadas con almidón oxidado de plátano. *Agrociencia*, 41, 837-844.