

## OBTENCIÓN DE BIOPÉPTIDOS MEDIANTE FERMENTACIÓN LÁCTICA DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA DEL FRIJOL BAYO AZTECA <sup>a</sup>

### OBTAINING BIOPEPTIDES THROUGH LACTIC FERMENTATION OF THE RESERVE PROTEINS OF BAYO AZTECA BEANS

Reyes-Bautista, R.<sup>1\*</sup>; Hernández-Mendoza, G.<sup>1</sup>; Xoca-Orozco, L.A.<sup>1</sup> y Flores-Sierra, J.J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tecnológico Nacional de México/ITS Purísima del Rincón. Blvd. del Valle No. 2301, Guardarrayas, C.P. 36425, Purísima del Rincón, Guanajuato, México.

\* E-mail: raul.rb@purisima.tecnm.mx (Autor de correspondencia)

Fecha de envío: 13, enero, 2023

Fecha de publicación: 30, junio, 2023

#### Resumen:

Las enfermedades crónico-degenerativas representan hoy en día un problema de salud pública. Los componentes de los alimentos como lo son las proteínas han demostrado que pueden ejercer un efecto benéfico a la salud cuando se liberan secuencias encriptadas mediante la hidrólisis enzimática o por acción de microorganismos. En el presente estudio se evaluó la capacidad de generar péptidos con actividad antidiabética y antihipertensiva, a través de la inhibición in vitro de las enzimas DPP-IV y ECA, respectivamente. La obtención de péptidos se realizó mediante fermentación láctica de la fracción proteínica del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv Bayo Azteca y *Lactobacillus sporogenes*. El crecimiento de *L. sporogenes* fue de  $6.30 \times 10^8$  UFC/mL, el máximo grado de inhibición fue de 63.21%, los valores de inhibición de la DPP-IV y la ECA fueron 67.89 y 42.16 %, respectivamente. La purificación mediante Sephadex G-15 mostró cuatro principales fracciones: F-I (26.9 kDa), F-II (16.2 kDa), F-III (2.3 kDa) y F-IV (0.85 kDa), se encontró que las fracciones de menor peso molecular (entre 7-9 aminoácidos) son las que presentaron mayor potencia de inhibición. Para F-IV los valores de IC<sub>50</sub> fueron de  $74.5 \pm 2.81$  y  $101.81 \pm 5.54$  mg/mL, para la inhibición de la DPP-IV y ECA respectivamente. Estos resultados son altamente prometedores para la realización de hidrolizados proteínicos mediante fermentación láctica de fuentes de proteínas subutilizadas como las del frijol.

**Palabras clave:** Biopéptidos, frijol, hidrolizados proteínicos, actividad antidiabética, actividad antihipertensiva

<sup>a</sup> El presente estudio fue un proyecto de investigación financiado por el TecNM

## Abstract:

Chronic-degenerative diseases represent today a public health problem. Food components such as proteins have shown that they can have effects that benefit health when encrypted sequences are released through enzymatic hydrolysis or by the action of microorganisms. In this study we will explain the ability to generate peptides with antidiabetic and antihypertensive activity was evaluated through in vitro inhibition of the DPP-IV and ACE enzymes, respectively. Peptides were obtained by lactic fermentation of the protein fraction of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cv Bayo Azteca and *Lactobacillus sporogenes*. The growth of *L. sporogenes* was  $6.30 \times 10^8$  CFU/mL, the maximum degree of inhibition was 63.21%, and the inhibition values of DPP-IV and ACE were 67.89 and 42.16%, respectively. Purification by Sephadex G-15 showed four main fractions: F-I (26.9 kDa), F-II (16.2 kDa), F-III (2.3 kDa) and F-IV (0.85 kDa). It was found that the fractions with the lowest molecular weight (between 7-9 amino acids) are the ones that presented the greatest potency of inhibition. For F-IV the IC<sub>50</sub> values were  $74.5 \pm 2.81$  and  $101.81 \pm 5.54$  mg/mL, for DPP-IV and ACE inhibition respectively. These results are highly promising for the realization of protein hydrolysates by lactic fermentation of underutilized protein sources such as those beans.

**Keywords:** Biopeptides, beans, protein hydrolysates, antidiabetic activity, antihypertensive activity.

## INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud, se estima que ocurrieron 41 millones de muertes en 2016 debido a enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), lo que representa el 71% del total mundial de 57 millones de muertes. Las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas y la diabetes son las cuatro enfermedades principales que explican la mayoría de las muertes, con 17.9 millones (44 %), 9.0 millones (22 %), 3.8 millones (9 %) y 1.6 millones (4 %) de muertes, respectivamente (WHO, 2018; de Fátima Garcia et al., 2021).

La diabetes y la hipertensión están altamente asociadas y se consideran problemas de salud pública mundial debido a su alta incidencia. Según la Federación Internacional de Diabetes (IDF, 2021), hay 537 millones de personas con diabetes en todo el mundo. La diabetes gestacional, la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2 (DM2) son los tres tipos principales de esta enfermedad, donde esta última, es la responsable de alrededor del 90% de todos los casos. Además, la diabetes puede provocar enfermedades cardiovasculares, amputaciones, insuficiencia renal y ceguera, debido a los niveles persistentemente altos de glucosa en sangre que provocan un daño vascular generalizado que afecta al corazón, los nervios, los

riñones y los ojos. Con respecto a la hipertensión, la incidencia es aún mayor, al presentarse 1,130 millones en 2015, así mismo la hipertensión también es un factor de riesgo importante para las enfermedades cardiovasculares y la enfermedad renal crónica (WHO, 2018; Sun et al., 2022; Zhou et al., 2017).

En este contexto, cabe mencionar que algunos compuestos vegetales y animales pueden tener una influencia positiva en la salud humana, al actuar en tejidos o células específicas, a estos se les ha denominado compuestos bioactivos (Astley & Finglas, 2016).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) representa uno de los alimentos de mayor importancia en México, ya que junto con el maíz aportan prácticamente la totalidad de las proteínas vegetales que consumen los estratos sociales de bajos ingresos de la ciudad y del campo, los cuáles ocupan un lugar predominante dentro de la dieta. El contenido nutricional de los frijoles hace de ellos uno de los alimentos más importantes para la prevención y/o regulación de muchas enfermedades y padecimientos presentes en el perfil epidemiológico de la población: enfermedades cardiovasculares, diabetes, sobrepeso y obesidad, cáncer de colon, entre otras (Carmona-García et al., 2007).

El frijol es considerado una leguminosa con alto contenido en proteína (14 – 33%), en las últimas décadas, el frijol común ha sido considerado como un alimento nutracéutico por su contenido en compuestos bioactivos como polifenoles, almidón resistente, oligosacáridos, fracción no digerible y péptidos bioactivos (Campos-Vega et al., 2013; Luna Vital et al., 2014). Algunos estudios han demostrado que las secuencias peptídicas encriptadas en sus proteínas poseen capacidad antihipertensiva, antioxidante y anticancerígena (Luna Vital et al., 2014; Valdez-Ortiz et al., 2012).

Varios estudios *in vitro*, *in vivo* y clínicos han revelado que el consumo de frijol común está asociado a una reducción significativa del riesgo y/o incidencia de enfermedades no transmisibles. Por ejemplo, al incluir el frijol como parte de la dieta, es capaz de reducir los niveles de obesidad (Barrett & Udani, 2011), modular los procesos cardiovasculares (Ariza-Ortega et al., 2014), agente quimiopreventivo (Thompson et al., 2012), así como mejorar las complicaciones de la diabetes tipo 2 (Hernández-Saavedra et al., 2013).

Bayo Azteca, es la primera variedad mejorada de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), con resistencia a una plaga insectil (picudo del ejote, *Apion godmani* Wagner); la cuál ha sido obtenida por el programa de frijol del Campo Experimental Valle de México, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias por cruza múltiple (Garza-García et al., 2010).

La enzima Dipeptidil Peptidasa - IV (DPP-IV) es una glicoproteína de membrana plasmática de 110 kDa que pertenece a la familia de las prolil oligopeptidasas (Nong & Hsu, 2021). Esta enzima funcional es responsable de la degradación de las hormonas incretinas, el péptido 1 análogo al glucagón (GLP-1) y el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP); dichas hormonas están relacionadas con la homeostasis de la glucosa en sangre, ya que son liberadas después de la ingesta de alimentos y son responsables de promover la secreción de insulina hasta aproximadamente un 60% de la insulina total de las células  $\beta$  pancreáticas, regulando así la glucosa en sangre posprandial (Andersen et al., 2018; Deacon, 2018; Yan et al., 2019).

La enzima convertidora de angiotensina (ECA), es responsable de la activación de un vasoconstrictor (angiotensina-II deca péptido) y la degradación de un vasodilatador (bradicinina), lo que provoca un aumento de la presión arterial. Por lo tanto, la inhibición de la ECA es uno de los enfoques establecidos en el tratamiento de la hipertensión (Daskaya-Dikmen et al., 2017).

Existen diversos trabajos donde se han utilizado enzimas para hidrolizar fracciones proteínicas *in vitro*, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el proceso de fermentación láctica como un método para producir péptidos inhibidores de la DPP-IV y ECA, derivados de la fracción de proteínas del frijol Bayo Azteca.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestra biológica

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cv Bayo Azteca, fue obtenido del Campo Experimental del Valle de México (CEVAMEX) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), cosechado en el año 2019, en el campo Santa Lucía. Los granos de frijol fueron sometidos a una molienda seca utilizando un molino IKA A-10 Basic, la harina obtenida se pasó a través de un tamiz con un tamaño de malla 60 (250  $\mu$ m).



### **Extracción de la fracción proteínica de las semillas de frijol**

Las proteínas de las semillas del frijol fueron extraídas siguiendo el método descrito por Betancur-Ancona *et al.* (2004) con algunas modificaciones, el procedimiento se basa en la solubilización de la fracción proteínica con una posterior precipitación mediante el punto isoeléctrico. Para ello se utilizó 300 g de harina de frijol, la cual se colocó en solución acuosa en una relación (1:6 p/v), adicionando NaOH (1M), para ajustar el pH a 11, la mezcla se mantuvo en agitación constante (150 rpm), durante 60 min, a continuación, la suspensión se hizo pasar a través de un tamiz de malla 80 para separar los sólidos de fibra de la porción líquida que contendrá proteína y almidón. Se utilizó agua destilada para lavar el sólido residual. La suspensión resultante se pasó de nuevo a través de un tamiz de malla 80. Los sobrenadantes de los dos filtrados se mezclaron y la fibra residual se descartó. Los sobrenadantes se pasaron a través de un tamiz húmedo de malla 150 para eliminar la fibra más fina. Esta suspensión filtrada se dejó sedimentar durante 30 min para recuperar el almidón precipitado, el sobrenadante tendrá la proteína solubilizada. Para las proteínas solubilizadas, el pH se ajustará a 4.5 con HCl 1M y luego se centrifugó (13000 g x 15min a 4°C), se descartó el sobrenadante y se liofilizó el precipitado.

### **Fermentación de las fracciones proteínicas de la semilla de frijol**

A partir de un cultivo comercial de probióticos, se aisló la bacteria *Lactobacillus sporogenes*, el cual se sembró en medio MRS. El medio de cultivo para la fermentación se realizó según lo reportado por Ayala-Niño *et al.* (2019) con algunas modificaciones, se utilizó glucosa (20 g/L), la concentración de proteína (40 g/L), para cada una de las fracciones seleccionadas, el medio se enriqueció con citrato de amonio (2 g/L), sorbitán monoleato (0.01 g/L), acetato de sodio (5 g/L) y fosfato dipotásico (2 g/L). Durante la cinética de fermentación se monitoreo cada 3 h, durante 15 h, la muestra se centrifugó y el sobrenadante se almacenó (-20 °C) para realizar los análisis de recuento en placa, medición del pH, cuantificación de proteína soluble (Lowry *et al.*, 1951), grado de hidrólisis y bioactividad.



### **Grado de hidrólisis (GH)**

Se analizó GH para grupos amino libres, según el método descrito por Adler-Nissen (1979). Se añadió 1 ml de tampón fosfato 0.5 M, pH 8.2 y 1 ml de solución de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico en agua (1 mg/ml) a 125 µl de proteína hidrolizada entre 3 y 15 h. La mezcla de reacción se incubó durante 1 h a 50 °C en la oscuridad debido a que la luz acelera la reacción. La trinitrofenilación se detuvo mediante la adición de 2 ml de HCl 0.1 N; la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 30 min; la absorbencia se leyó a 340 nm frente al agua. El blanco se preparó de la misma manera. El GH se calculó de mediante la ecuación (1).

$$\% GH = (h/h_{tot}) \times 100 \quad (1)$$

Donde  $h$  es la hidrólisis evaluada por la acción microbiana a través del tiempo y  $h_{tot}$  es la hidrólisis completa de la proteína (evaluada con HCl 6N, 121 °C durante 24 h)

### **Cromatografía de exclusión molecular**

La caracterización del peso molecular de los hidrolizados obtenidos, se llevó a cabo mediante cromatografía de filtración en gel utilizando una columna de exclusión molecular (Tovar-Pérez et al., 2009). Se utilizaron una columna Sephadex G-15 (1.4 x 29 cm; Pharmacia, Uppsala, Suecia) y un sistema Pharmacia LKB FPLC (Uppsala, Suecia). 500 µL de proteínas hidrolizadas (15 mg/mL) se disolvieron en una solución de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 32.5 mM-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.6 mM, pH 7.5, que contenía NaCl 0.4 M y 2-mercaptoetanol 20 mM, se inyectaron y eluyeron con el mismo tampón a 0.3 mL/min. Se midieron las fracciones a 214 nm en un lector de microplacas (Multi Skan SKY, ThermoFisher Scientific), se recolectaron fracciones de 0.5 ml. Se utilizó un marcador de peso molecular de rango ultrabajo (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., EE. UU.), que contenía triosa fosfato isomerasa 26.6 kDa; mioglobina 17 kDa; α-lactoalbúmina 14.2 kDa; aprotinina 6.5 kDa; insulina 3.5 kDa; bradicinina 1.06 kDa. Las fracciones peptídicas recogidas se liofilizaron y almacenaron a -20 °C hasta su análisis.



### Actividad antidiabética

La actividad de la enzima hipoglucemiante (*in vitro*) se realizó mediante la inhibición de la enzima DPP-IV (D4943; Sigma–Aldrich; St. Louis, MO, USA). El ensayo se realizó de acuerdo a Ketnawa *et al.* (2019) con algunas modificaciones. Las muestras se reconstituyeron en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8.0) a concentraciones de 5, 10 y 20 mg de proteína por mL (0.0125, 0.125 y 1.25 mg mL<sup>-1</sup> como concentración final del ensayo). Cada muestra de ensayo a diferentes concentraciones (25 µL) se preincubó con 25 µL de sustrato Gly-Pro-p-nitroanilida (gly-pro- pNA, 6 mM) en una microplaca de 96 pozos a 37 °C durante 10 min, después de lo cual se añadieron 50 µL de DPP-IV recombinante humana (4.50 unidades·mL<sup>-1</sup>) y la mezcla se incubó a 37 °C durante 60 min. La reacción enzimática se terminó añadiendo 100 µl de tampón de acetato de sodio 1 M (pH 4.0), y la absorbencia de la p-nitroanilida (PN) liberada se midió a 405 nm utilizando un lector de microplacas (Multi Skan SKY, ThermoFisher Scientific). Cada muestra de ensayo se analizó por triplicado, y los valores de absorbencia se corrigieron para los blancos de la muestra en los que la DPP-IV se sustituyó por el tampón Tris-HCl (100 mM, pH 8.0). El control positivo (actividad de la DPP-IV sin inhibidor) y el control negativo (sin actividad de la DPP-IV) se prepararon utilizando tampón Tris-HCl (100 mM, pH 8.0) en lugar de la muestra y la solución de DPP-IV. El grado de inhibición se determinó mediante la ecuación (2).

$$(\%) \text{ inhibición DPP - IV} = \left\{ \frac{1 - [A_{405}(\text{muestra}) - A_{405}(\text{blanco})]}{[A_{405}(\text{control positivo}) - A_{405}(\text{control negativo})]} \right\} \times 100 \quad (2)$$

Utilizando como control (+) en buffer (DPP-IV sin inhibidor), control (-) (DPP-IV sin actividad). Los ensayos fueron analizados por triplicado.

### Actividad antihipertensiva

La actividad antihipertensiva (*in vitro*) de las fracciones se evaluó por inhibición de la actividad de la ECA-I. Para la inhibición de la ECA, se utilizó Hippuryl-His-Leu (HHL) como sustrato según el método de Ketnawa *et al.* (2019) con ligeras modificaciones. La mezcla de reacción contenía 10 µL de cada muestra de ensayo a diferentes concentraciones de proteína (1.25, 2.5 y 5 mg de proteína por mL)



disuelta en tampón fosfato sódico 100 mM (pH 8.3) que contenía 300 mM de NaCl, 25  $\mu$ L de HHL 5 mM y 80  $\mu$ L (5 mU) de ECA. En la mezcla de reacción de control, se utilizaron 10  $\mu$ L de solución tampón en lugar de la muestra de ensayo. Las muestras de sustrato e hidrolizado se mezclaron y se incubaron a 37 °C durante 5 minutos. La ECA también se mantuvo a 37 °C durante 5 min. Se mezclaron ambas soluciones y se incubaron de nuevo a 37 °C durante 80 minutos en un baño de agua bajo agitación constante (160 oscilaciones por minuto). La reacción enzimática se detuvo añadiendo 50  $\mu$ l de HCl 1 M. El ácido hipúrico (HA) liberado se cuantificó por HPLC utilizando una columna analítica C18 (YMC Pack ODS AM 12505-2546WT, YMC América, Inc., Allentown, PA, USA). El volumen de inyección fue de 50  $\mu$ L y la muestra se eluyó a un flujo de 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. Como fases móviles se utilizaron agua con 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) eluyente A y acetonitrilo con 0.1% (v/v) de TFA (eluyente B). La columna se desarrolló con un 20% de eluyente B durante 5 minutos, seguido de un gradiente lineal de 60% de eluyente B durante los siguientes 15 minutos. La elución se mantuvo de forma isocrática al 60% de eluyente B durante 4 minutos y luego se volvió a la composición inicial del eluyente B al 20% durante 2 minutos, con una duración total de 26 minutos. Los picos de elución de HA y HHL se leyeron a 228 nm. El grado de inhibición se determinó mediante la ecuación (3).

$$(\%) \text{ inhibición ECA} = \left\{ \left( 1 - \frac{A_{\text{inhibidor}}}{A_{\text{control}}} \right) \right\} \times 100 \quad (3)$$

Donde  $A_{\text{inhibidor}}$  y  $A_{\text{control}}$  expresan las áreas relativas (A) del pico de HA de los ensayos realizados con y sin inhibidores de la ECA, respectivamente. Los ensayos fueron analizados por triplicado.

### Determinación del valor IC<sub>50</sub>

Los valores de concentración inhibitoria media-máxima (IC<sub>50</sub>) se calcularon de acuerdo con lo reportado por Tovar-Pérez et al. (2009) representando gráficamente el logaritmo de la concentración de ambas fracciones proteínicas aisladas (mg/mL) frente a la actividad inhibitoria de las enzimas DPP-IV (%) y ECA (%).



## Análisis estadístico

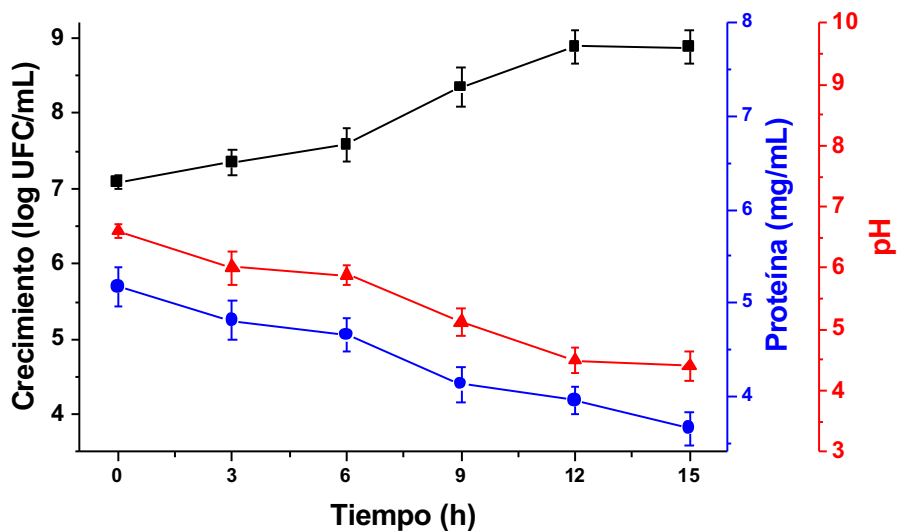
Todos los análisis se realizaron por triplicado y fueron expresados como el valor medio  $\pm$  la desviación estándar. Los datos se analizaron mediante la prueba de ANOVA de una vía para determinar los efectos de los tratamientos y las diferencias entre los valores medios se compararon mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . El programa estadístico empleado fue Minitab 18 (State College, PA 16801, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se muestra la cinética de fermentación del cultivo de *L. sporegenes*, se puede observar que a partir de las 12 h de fermentación no existieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el conteo viable alcanzándose un valor de  $6.30 \times 10^8$  UFC/mL. EL valor del pH descendió en dos unidades de 6.61 a 4.4 y el contenido de proteína bajo de 5.17 a 3.65 mg/mL derivado del proceso de fermentación láctica, lo cual indica que *L. soporogenes* utilizó la fracción de proteínas del frijol Bayo Azteca como fuente de nitrógeno. Rui *et al.* (2015) realizando un estudio en frijol blanco con cuatro tipos de cepas de genero *Lactobacillus* (*L. bulgaricus*, *L. helveticus* MB2-1, *L. plantarum* B1-6, y *L. plantarum* 70810), encontraron un comportamiento similar en el crecimiento microbiano utilizando la fuente de proteína de las semillas de este tipo de frijol, la tasa de disminución del pH indica el aumento en el crecimiento de las cepas. Algunos estudios previos demostraron que la disminución del pH dependía de la cepa (Zhang et al., 2014). Esto se atribuyó principalmente a las discrepancias en la actividad metabólica y los requisitos de crecimiento de las diferentes cepas (Elfahri et al., 2014).

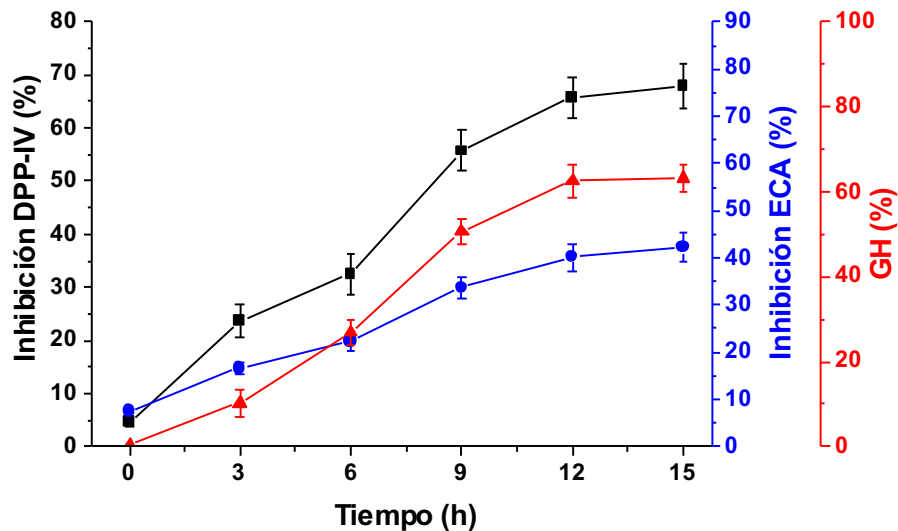
En la Figura 2 se presenta la cinética del grado de hidrólisis, determinado por la exposición de los grupos amino libres, este parámetro fue significativo ( $p \leq 0.05$ ) a lo largo de la hidrólisis con un valor máximo de  $63.21 \pm 3.15$  % (dentro de las primeras 12h de fermentación), sin embargo después de las 12 h de fermentación este parámetro no presentó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Se encontró a las 15 h de fermentación la inhibición de la DPP-IV de  $67.89 \pm 4.09$  % y la inhibición de la ECA fue de  $42.16 \pm 2.99$  %. Wu *et al.* (2018) realizaron la fermentación en estado sólido de avena integral (*Avena sativa* L.), la cual se inoculó con

*Lactobacillus plantarum* B1-6, *Rhizopus oryzae* y la combinación de ambos, los autores encontraron que el valor máximo del grado de hidrólisis (GH) para la avena co-inoculada fermentada fue 6.06%, mientras que el GH para la avena que se inoculó con *R. oryzae* fue 1.42 veces menor, estos resultados indican que en nuestro caso el grado de hidrólisis alcanzado fue 10 veces mayor en comparación con la avena integral. Ayala-Niño *et al.* (2019) reportaron que la mayor actividad de inhibición de la ECA se obtuvo en hidrolizados de proteína total del amaranto la cual se hidrolizó mediante fermentación ácido-láctica con *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus* 54102 en monocultivo a las 36 h de fermentación, sus resultados finales revelaron que una mayor concentración de grupos amino se relacionó con una mayor actividad antihipertensiva de  $38.38 \pm 0.98$  (36 h),  $36.14 \pm 1.32$  (32 h),  $45.22 \pm 0.28$  (36 h), para *Lactobacillus casei* Shirota, *Streptococcus thermophilus* 54102 y cultivo combinado, respectivamente.



**Figura 1.** Cinética de fermentación de la fracción proteínica del frijol Bayo Azteca inoculado con *L. sporogenes*. Cuadros negros viabilidad microbiana (log UFC/mL), círculos azules proteína (mg/mL) y triángulos rojos valores de pH a lo largo de la fermentación.

**Figure 1.** Fermentation kinetics of the protein fraction of Bayo Azteca beans inoculated with *L. sporogenes*. Black boxes microbial viability (log CFU/mL), blue circles protein (mg/mL) and red triangles pH values throughout the fermentation.

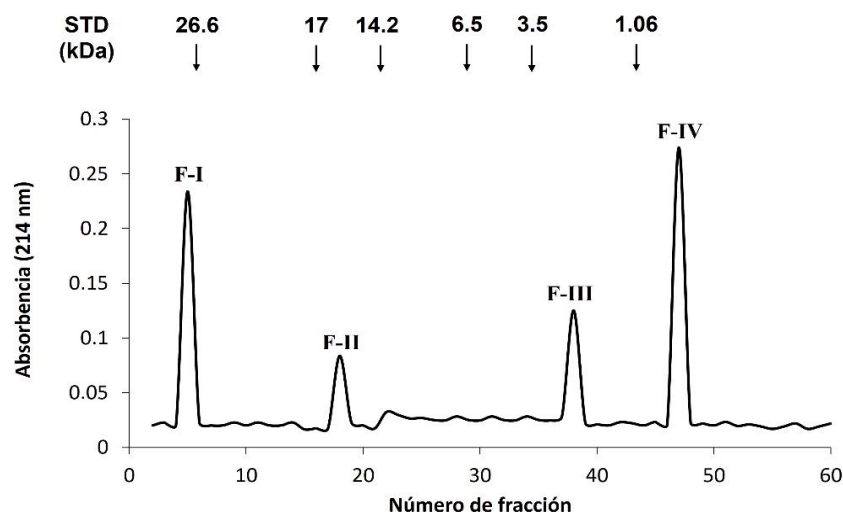


**Figura 2.** Evaluación del grado de hidrólisis (rombos rojos), inhibición de la DPP-IV (cuadros negros) y ECA (círculos azules) a lo largo de la fermentación con *L. sporogenes*, para la fracción proteínica del frijol Bayo Azteca.

**Figure 2.** Evaluation of the degree of hydrolysis (red diamonds), inhibition of DPP-IV (black squares) and ACE (blue circles) throughout the fermentation with *L. sporogenes*, for the protein fraction of Bayo Azteca beans.

La separación cromatográfica (Figura 3) del hidrolizado de 15 h de fermentación reveló cuatro principales fracciones: F-I (26.9 kDa), F-II (16.2 kDa), F-III (2.3 kDa) y F-IV (0.85 kDa). Esto indica que son péptidos entre 7-9 aminoácidos, donde algunos autores han reportado que estas secuencias pueden actuar de diferentes formas: i) causando un impedimento estérico en el sitio activo de la enzima, mediante formación de enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, entre otras, ii) podrían competir por el sitio activo de la enzima y causar inhibición del tipo competitiva, etc. (Nong & Hsu, 2021; Vilcacundo et al., 2017).





**Figura 3.** Perfil de elución por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-15 del hidrolizado de 15h de la fracción proteínica del frijol Bayo Azteca. STD, estándar de proteínas; kDa, peso molecular del estándar de proteínas.

**Figure 3.** Elution profile by size exclusion chromatography on Sephadex G-15 of the 15h hydrolyzate of the protein fraction of Bayo Azteca bean. STD, protein standard; kDa, molecular weight of the protein standard.

Los valores de  $IC_{50}$ , que es la concentración de proteína/péptido que causa el 50% de inhibición enzimática, para las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular donde se encontró que el hidrolizado completo H-15h presentó un valor de  $IC_{50}$  de  $74.5 \pm 2.81$  y  $101.81 \pm 5.54$  mg/mL, para la inhibición de la DPP-IV y ECA, respectivamente, no se encontró efecto de inhibición de las fracciones F-I y F-II, para ninguna de las enzimas analizadas. Las fracciones de bajo peso molecular mostraron una mayor capacidad de inhibición, F-IV (0.85 kDa) de  $0.32 \pm 0.01$  y  $1.41 \pm 0.15$  mg/mL para la inhibición de la DPP-IV y ECA, respectivamente. La fracción F-IV presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), para los valores de  $IC_{50}$  para las enzimas DPP-IV y ECA. Las diferencias encontradas entre los valores de  $IC_{50}$  encontradas en este estudio se encuentran directamente relacionadas con el peso molecular, diversos autores han encontrado que los inhibidores de las enzimas DPP-IV y ECA son de tipo competitivo y que péptidos de menor peso molecular ( $< 1$  kDa) son los péptidos que presentan mayor grado de inhibición debido a que causan interferencia en el sitio catalítico de las enzimas estudiadas (Soriano-Santos et al., 2015).

**Cuadro 1.** Valores de IC<sub>50</sub> de las fracciones proteínicas/peptídicas obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en Saphadex G-15 sobre la inhibición de las enzimas DPP-IV y ECA.

**Table 1.** IC<sub>50</sub> values of the protein/peptide fractions obtained by size exclusion chromatography on Saphadex G-15 on the inhibition of DPP-IV and ACE enzymes.

Fracción proteínica/ peptídica	IC <sub>50</sub> * (mg/mL)	
	DPP-IV	ECA
H-15h	74.5 ± 2.81 <sup>*a</sup>	101.81 ± 5.54 <sup>a</sup>
F-I	ND*	ND
F-II	ND	ND
F-III	13.09 ± 1.84 <sup>b</sup>	27.84 ± 1.98 <sup>b</sup>
F-IV	0.32 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.41 ± 0.15 <sup>c</sup>

\*El valor de IC<sub>50</sub> fue determinado por análisis de regresión lineal del % inhibición vs. log de la concentración de péptido (mg/mL).

\*No detectado bajo las condiciones del ensayo.

\*Los datos representan la media ± la desviación estándar de las determinaciones realizadas por triplicado.

Letras diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas (p<0.05).

## CONCLUSIÓN

El frijol al ser una fuente económica y de fácil acceso para la población de bajos recursos económicos, podría ser una alternativa dirigida, para ser utilizado durante la prevención y/o regulación de muchas enfermedades crónico-degenerativas. El buscar alternativas para poder coadyuvar el control de glucosa en sangre en personas con diabetes mellitus tipo 2 así como la reducción en la presión arterial en personas con hipertensión, permitiría tener un mejor control de estas enfermedades, que actualmente se encuentran fuera de control y que son problema de salud pública. En este estudio se encontró que la variedad de frijol Bayo Azteca presenta grandes cualidades, entre las que se encuentran la capacidad para inhibir la DPP-IV y ECA (de forma *in vitro*), mediante tecnología de fermentación láctica de las proteínas de reserva de esta variedad, por lo que se podrían utilizar este tipo de hidrolizados para el control de la diabetes mellitus tipo 2 e hipertensión, de manera complementaria al tratamiento farmacológico y la dieta.

## LITERATURA CITADA

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256–1262. <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>
- Andersen, E. S., Deacon, C. F., & Holst, J. J. (2018). Do we know the true mechanism of action of the DPP-4 inhibitors? *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 20(1), 34–41. <https://doi.org/10.1111/dom.13018>
- Ariza-Ortega, T. de J., Zenón-Briones, E. Y., Castrejón-Flores, J. L., Yáñez-Fernández, J., Gómez-Gómez, Y. de las M., & Oliver-Salvador, M. del C. (2014). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory, antimicrobial, and antioxidant effect of bioactive peptides obtained from different varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) with in vivo antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. *European Food Research and Technology*, 239(5), 785–794. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2271-3>
- Astley, S., & Finglas, P. (2016). Nutrition and Health. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03425-9>
- Ayala-Niño, A., Rodríguez-Serrano, G. M., Jiménez-Alvarado, R., Bautista-Avila, M., Sánchez-Franco, J. A., González-Olivares, L. G., & Cepeda-Saez, A. (2019). Bioactivity of Peptides Released During Lactic Fermentation of Amaranth Proteins with Potential Cardiovascular Protective Effect: An In Vitro Study. *Journal of Medicinal Food*, 22(10), 976–981. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0039>
- Barrett, M. L., & Udani, J. K. (2011). A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): A review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutrition Journal*, 10(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-24>
- 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. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1804>
- Campos-Vega, R., Oomah, B., Loarca-Piña, G., & Vergara-Castañeda, H. (2013). Common Beans and Their Non-Digestible Fraction: Cancer Inhibitory Activity—An Overview. *Foods*, 2(3), 374–392. <https://doi.org/10.3390/foods2030374>
- Carmona-García, R., Osorio-Díaz, P., Agama-Acevedo, E., Tovar, J., & Bello-Pérez, L. A. (2007). Composition and effect of soaking on starch digestibility of *Phaseolus vulgaris* (L.) cv. 'Mayocoba.' *International Journal of Food Science & Technology*, 42(3), 296–302. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01218.x>

- Daskaya-Dikmen, C., Yucetepe, A., Karbancioglu-Guler, F., Daskaya, H., & Ozcelik, B. (2017). Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Peptides from Plants. *Nutrients*, 9(4), 316. <https://doi.org/10.3390/nu9040316>
- Deacon, C. F. (2018). Peptide degradation and the role of DPP-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Peptides*, 100, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.10.011>
- de Fátima Garcia, B., de Barros, M., & de Souza Rocha, T. (2021). Bioactive peptides from beans with the potential to decrease the risk of developing noncommunicable chronic diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(12), 2003–2021. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1768047>
- Elfahri, K. R., Donkor, O. N., & Vasiljevic, T. (2014). Potential of novel *Lactobacillus helveticus* strains and their cell wall bound proteases to release physiologically active peptides from milk proteins. *International Dairy Journal*, 38(1), 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.03.010>
- Garza-García, R., Jacinto-Hernández, C., & Garza-García, D. (2010). Bayo Azteca, primera variedad mejorada de frijol con resistencia a *Apion godmani* Wagner. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(5), 651–656. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342010000500001&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342010000500001&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Hernández-Saavedra, D., Mendoza-Sánchez, M., Hernández-Montiel, H. L., Guzmán-Maldonado, H. S., Loarca-Piña, G. F., Salgado, L. M., & Reynoso-Camacho, R. (2013). Cooked Common Beans (*Phaseolus vulgaris*) Protect Against  $\beta$ -cell Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(2), 207–212. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0353-1>
- Ketnawa, S., Suwal, S., Huang, J., & Liceaga, A. M. (2019). Selective separation and characterisation of dual ACE and DPP - IV inhibitory peptides from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) protein hydrolysates. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(4), 1062–1073. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13939>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>
- Luna Vital, D. A., González de Mejía, E., Dia, V. P., & Loarca-Piña, G. (2014). Peptides in common bean fractions inhibit human colorectal cancer cells. *Food Chemistry*, 157, 347–355. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.050>
- Nong, N. T. P., & Hsu, J.-L. (2021). Characteristics of Food Protein-Derived Antidiabetic Bioactive Peptides: A Literature Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9508. <https://doi.org/10.3390/ijms22179508>



- Rui, X., Wen, D., Li, W., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2015). Enrichment of ACE inhibitory peptides in navy bean (*Phaseolus vulgaris*) using lactic acid bacteria. *Food & Function*, 6(2), 622–629. <https://doi.org/10.1039/C4FO00730A>
- Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B. B., Stein, C., Basit, A., Chan, J. C. N., Mbanya, J. C., Pavkov, M. E., Ramachandaran, A., Wild, S. H., James, S., Herman, W. H., Zhang, P., Bommer, C., Kuo, S., Boyko, E. J., & Magliano, D. J. (2022). IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183, 109119. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119>
- Thompson, M. D., Mensack, M. M., Jiang, W., Zhu, Z., Lewis, M. R., McGinley, J. N., Brick, M. A., & Thompson, H. J. (2012). Cell signaling pathways are associated with reducing mammary cancer burden by dietary common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Carcinogenesis*, 33(1), 226–232. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr247>
- Valdez-Ortiz, A., Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J., Gutiérrez-Dorado, R., & Medina-Godoy, S. (2012). Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.10.021>
- Vilcacundo, R., Martínez-Villaluenga, C., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Release of dipeptidyl peptidase IV,  $\alpha$ -amylase, and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 35, 531–539. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.024>
- World Health Organization. (2018). World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. World Health Organization.
- Wu, H., Rui, X., Li, W., Xiao, Y., Zhou, J., & Dong, M. (2018). Whole-grain oats (*Avena sativa* L.) as a carrier of lactic acid bacteria and a supplement rich in angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides through solid-state fermentation. *Food & Function*, 9(4), 2270–2281. <https://doi.org/10.1039/C7FO01578J>
- Yan, J., Zhao, J., Yang, R., & Zhao, W. (2019). Bioactive peptides with antidiabetic properties: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(6), 1909–1919. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14090>
- Zhang, S., Shi, Y., Zhang, S., Shang, W., Gao, X., & Wang, H. (2014). Whole soybean as probiotic lactic acid bacteria carrier food in solid-state fermentation. *Food Control*, 41, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.026>

Zhou, B., Bentham, J., di Cesare, M., Bixby, H., Danaei, G., Cowan, M. J., Paciorek, C. J., Singh, G., Hajifathalian, K., Bennett, J. E., Taddei, C., Bilano, V., Carrillo-Larco, R. M., Djalalinia, S., Khatibzadeh, S., Lugero, C., Peykari, N., Zhang, W. Z., Lu, Y., ... Zuñiga Cisneros, J. (2017). Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19·1 million participants. *The Lancet*, 389(10064), 37–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31919-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31919-5)

