



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

**OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEICOS DE FRIJOL
AYOCOTE Y SU CARACTERIZACIÓN**

TESIS

**Que como requisito parcial para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**

Presenta:

LILIA LUCÍA ESTRADA FABIÁN

Bajo la supervisión de: OFELIA SANDOVAL CASTILLA, DRA.



Chapingo, Estado de México, octubre de 2022

OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEICOS DE FRIJOL AYOCOTE Y SU CARACTERIZACIÓN

Tesis realizada por Lilia Lucía Estrada Fabián bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

Directora:



Dra. Ofelia Sandoval Castilla

Codirectora:



Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez

Asesor:



Dr. Eleazar Aguirre Mandujano

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS USADAS	ix
DEDICATORIAS	x
AGRADECIMIENTOS	xi
DATOS BIBLIOGRÁFICOS	xiii
RESUMEN GENERAL	xiv
GENERAL ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Leguminosas	4
2.1.1 El frijol	4
2.1.2 Frijol ayocote	6
2.1.3 Importancia del frijol en la alimentación	7
2.2 Concepto general de proteínas	8
2.2.1 Estructura de las proteínas	8
2.2.2 Importancia de las proteínas	9
2.2.3 Proteínas de origen vegetal	10
2.2.4 Digestibilidad de las proteínas	11
2.2.5 Propiedades tecno-funcionales de las proteínas	11
2.3 Hidrólisis de proteínas	14
2.3.1 Hidrólisis enzimática	15
2.3.2 Grado de hidrólisis	19
2.4 Actividad biológica de péptidos	19
2.4.1 Actividad antihipertensiva	20
2.4.2 Actividad antioxidante	23

2.6 Literatura citada	29
3. OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEICOS DE FRIJOL AYOCOTE Y SU CARACTERIZACIÓN	39
RESUMEN	39
ABSTRACT	40
3.1 INTRODUCCIÓN	41
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.2.1 Materiales	43
3.2.2 Obtención de la harina	43
3.2.3 Análisis químico proximal	44
3.2.4 Desgrasado de las muestras de harina	44
3.2.5 Perfil de aminoácidos	44
3.2.6 Obtención de aislados proteicos	44
3.2.7 Potencial Zeta (ζ)	46
3.2.8 Digestibilidad relativa	46
3.2.9 Propiedades tecno-funcionales	47
3.2.10 Hidrólisis enzimática	49
3.2.11 Actividad antioxidante	51
3.2.12 Actividad antihipertensiva	53
3.2.13 Análisis estadístico	54
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
3.3.1 Rendimiento en harina de frijol ayocote crudo y cocido	55
3.3.2 Caracterización químico proximal	55
3.3.3 Composición de aminoácidos	58
3.3.4 Solubilidad	61
3.3.5 Rendimiento proteico de los aislados de proteína	63
3.3.6 Digestibilidad proteica	63
3.3.7 Potencial Zeta (ζ)	65

3.3.8 Propiedades tecno-funcionales	67
3.3.9 Hidrólisis enzimática	78
3.3.10 Actividad antioxidante	80
3.3.11 Actividad antihipertensiva	86
3.3.12 Conclusiones	89
3.3.13 Literatura citada	91

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química de diferentes especies de leguminosas	7
Cuadro 2. Perfil de aminoácidos en harina de frijol ayocote	9
Cuadro 3. Método para la obtención de péptidos	16
Cuadro 4. Composición proximal de las harinas del frijol ayocote crudo y cocido.	57
Cuadro 5. Perfil de aminoácidos de harinas de frijol ayocote crudo (HFACr) y cocido (HFACo) y sus concentrados	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo del sistema renina-angiotensina (SRA) (De la Serna, 2006).	21
Figura 2. Esquema de la generación de ERO y ERN (Vargas et al., 2007)	24
Figura 3. Esquema de la generación exógena de radicales libres y efectos adversos del estrés oxidativo en la patogénesis de enfermedades (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013).	24
Figura 4. Mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno (TAH). (Fuente: Leopoldini et al., 2011).	26
Figura 5. Mecanismo de transferencia de un solo electrón (TSE) (Fuente: Leopoldini et al., 2011).	26
Figura 6. Mecanismo de quelación de metales de transición (QMT) (Fuente: Leopoldini et al., 2011).	27
Figura 7. Reacción del radical DPPH en presencia del compuesto antioxidante durante el ensayo DPPH (Fuente: Alam et al., 2013).	27
Figura 8. Reacción del radical ABTS en presencia del compuesto antioxidante durante el ensayo ABTS. (Zulueta y Frígola, 2009).	28
Figura 9. Solubilidad de proteínas de harina de frijol ayocote en función del pH.	62
Figura 10. Potencial Z (z) de los concentrados de proteína de frijol ayocote crudo (PFACr) y cocido (PFACo) como función del pH	67
Figura 11. Capacidad espumante. A) harina de frijol ayocote crudo (HFACr) y harina de frijol ayocote cocido (HFACo) y B) proteínas de frijol ayocote crudo (PFACr) y proteínas de frijol ayocote cocido (PFACo), a diferente pH.	72
Figura 12. Estabilidad espumante A) harina de frijol ayocote crudo (HFACr) y harina de frijol ayocote cocido (HFACo) y B) proteínas de frijol ayocote crudo (PFACr) y proteínas de frijol ayocote cocido (PFACo), a diferente pH.	74

Figura 13. Capacidad emulsionante. A) harina de frijol ayocote crudo (HFACr) y harina de frijol ayocote cocido (HFACo) y B) proteínas de frijol ayocote crudo (PFACr) y proteínas de frijol ayocote cocido (PFACo), a diferentes pH.	76
Figura 14. Capacidad gelificante. A) proteínas de frijol ayocote crudo (PFACr) y B) proteínas de frijol ayocote cocido (PFACo), a diferentes concentraciones.	78
Figura 15. Contenido de compuestos fenólicos totales. PFACr: proteínas de frijol ayocote crudo. PFACr H: Proteínas hidrolizadas de frijol ayocote crudo. PFACo: Proteínas de frijol ayocote cocido. PFACo H: Proteínas hidrolizadas de frijol ayocote cocido.	81
Figura 16. A) Captación del radical libre DPPH. B) Valores de IC ₅₀ sobre el radical DPPH. PFACr: proteínas de frijol ayocote crudo. PFACr H: Proteínas hidrolizadas de frijol ayocote crudo. PFACo: Proteínas de frijol ayocote cocido. PFACo H: Proteínas hidrolizadas de frijol ayocote cocido.	83
Figura 17. A) Captación del radical libre ABTS. B) Valores de IC ₅₀ sobre el radical ABTS. PFACr: proteínas de frijol ayocote crudo. PFACr H: Proteínas hidrolizadas de frijol ayocote crudo. PFACo: Proteínas de frijol ayocote cocido. PFACo H: Proteínas hidrolizadas de frijol ayocote cocido.	85
Figura 18. Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I. PFACr: proteínas de frijol ayocote crudo. PFACr H: Proteínas hidrolizadas de frijol ayocote crudo. PFACo: Proteínas de frijol ayocote cocido. PFACo H: Proteínas hidrolizadas de frijol ayocote cocido.	87

ABREVIATURAS USADAS

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

BSA: Albúmina sérica bovina

CE: Capacidad espumante

CEm: Capacidad emulsionante

CFT: Compuestos fenólicos totales

CMG: Concentración mínima de gelificación

CRA: Capacidad de retención de agua

CRG: Capacidad de retención de aceite

DGIS: Digestión gastrointestinal simulada

DPPH: radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil

DPR: Digestibilidad proteínica relativa

ECA-I: Enzima convertidora de angiotensina-I

EEs: Estabilidad de espuma

GH: Grado de hidrólisis

HA: Ácido hipúrico

HFACo: Harina de frijol ayocote cocido

HFACr: Harina de frijol ayocote crudo

HHL: hipuril-histidil-leucina

PFACo: Proteínas de frijol ayocote cocido

PFACr: Proteínas de frijol ayocote crudo

TEAC: Capacidad antioxidante equivalente de Trolox

TNBS: ácido 2,4,6-Trinitrobenzensulfónico

msnm: Metros sobre el nivel del mar

DEDICATORIAS

A Dios, por su infinito amor y misericordia, por salvarme y rescatarme de mi vana manera de vivir, por la esperanza de vida eterna que me da cada mañana. Al Dios Único y Verdadero, a Él sea toda la gloria, toda la honra, por los siglos de los siglos.

A mi mamá Tomasa Fabián Montalvo por ser una madre ejemplar, por enseñarme a ser constante y perseverante en cada etapa de mi vida, gracias por no rendirte y estar en todo momento para tus hijos. TE AMO.

A mis hermanos: Edgar, Anayeli, Edú, Ayaletth y Rodolfo por estar de manera incondicional en cada etapa de mi vida, por cuidarme en todo momento y por el amor no fingido que me dan.

A mis cuñados: Marcos, Breny, Thalía, Gustavo y Rosario por formar parte de mi familia y apoyarme en todo momento sin esperar nada a cambio.

A mis sobrinos: Diego, Edgar, Eder, Itamar, Marcos, Zaid, Misael y al pequeño que viene en camino, los amo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ofelia Sandoval Castilla por todo el apoyo brindado en este proyecto de investigación, por los conocimientos transmitidos, por su paciencia, disponibilidad, amabilidad y por haberme confiado esta gran labor dentro de esta área de investigación.

A la Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez por las asesorías brindadas de la parte experimental de este trabajo de investigación, por su amabilidad y paciencia desde el comienzo hasta la conclusión de la maestría.

Al Dr. Eleazar Aguirre Mandujano por sus aportes en la revisión de la escritura de la tesis y los conocimientos transmitidos durante la maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar los estudios de esta maestría.

Al programa de maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria por los financiamientos de adquisición de reactivos y materiales de laboratorio y a los profesores que lo conforman, por el aporte de conocimientos en cada semestre de la maestría.

A la Dra. Consuelo Silvia Olivia Lobato Calleros por las facilidades que me brindó para trabajar en los laboratorios de preparatoria agrícola.

A la Dra. Landy Hernández Rodríguez, por su acompañamiento como tutora en cada semestre de la maestría y por los conocimientos transmitidos.

A mis compañeros de laboratorio de alimentos funcionales e innovadores, especialmente a Adriana Herrero Galindo, por el apoyo brindado en cada experimento realizado y el aporte de conocimiento y experiencia en el área de investigación.

A mis compañeros: Jazmín, Laura, Daniela y Emmanuel por todo el apoyo brindado.

A mis amados hermanos en Cristo de la iglesia de Teotitlán de Flores Magón: Isías, Miriam, Luis, Zayra, Ricardo, Mélangy, Nohemí, Basilio, Yusmar y Zabdiel, por el cuidado que tuvieron de mí mientras me congregué con ustedes.

A mis amados hermanos de la iglesia de la ciudad de México, Comunidad Bíblica de la Gracia, por toda palabra de bendición a mi vida, por sus oraciones, por el cuidado que han tenido de mí desde el principio, especialmente a José Huerta y Araceli Gómez, por el cariño que me mostraron desde un principio, por tomarme como una hija, por cada consejo, cada palabra de exhortación y por las palabras de ánimo que me han dado en cada momento. Los amo en Cristo.

A la Dra. Rossana del Carmen Altamirano Fortoul y al maestro Israel Álvarez Velásquez por las palabras de ánimo y por ya no considerarme como una estudiante sino como una amiga.

A mis amigos: Uriel Carvajal Marín y Pedro García por su acompañamiento en este proceso.

DATOS BIBLIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Lilia Lucía Estrada Fabián

Fecha de nacimiento: 09 de agosto de 1994

Lugar de nacimiento: Santa María Teopoxco, Oaxaca.

CURP: EAFL940809MOCSBL01

Profesión: Ingeniero en agroindustrias

Cédula profesional: 12174116



Desarrollo académico

Bachillerato: Bachillerato integra comunitario número 19 (BIC 19)

Licenciatura: Universidad de la Cañada (UNCA)

RESUMEN GENERAL

Actualmente, debido al mayor conocimiento y conciencia de los ingredientes de los alimentos y la preferencia de consumo de alimentos que no afectan al medio ambiente, más personas eligen consumir proteínas de origen vegetal. El frijol es considerado como una alternativa de fuente de proteínas económicas con un perfil completo de aminoácidos, actividad biológica y propiedades funcionales. Sin embargo, no existe suficiente información acerca de las proteínas del frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar las propiedades tecno-funcionales de las proteínas del frijol ayocote y su actividad biológica, así como de sus hidrolizados, los cuales se obtuvieron mediante una hidrólisis secuencial con pepsina y pancreatina. Como resultado, las proteínas presentaron propiedades espumante, emulsificante y gelificante. Se observó un aumento significativo en la capacidad espumante de las proteínas de frijol tratado térmicamente, mientras que la capacidad emulsionante fue influenciada por la solubilidad de las proteínas. A pH 7 se observó la formación de geles con una concentración mínima de gelificación de 12 % (p/v). Por su parte, las proteínas y sus hidrolizados presentaron actividad antioxidante sobre los radicales DPPH y ABTS, mayor actividad en los hidrolizados de frijol que fue sometido a tratamiento térmico, así mismo, todas las muestras presentaron concentraciones de compuestos fenólicos, los cuales pudieron haber contribuido con la actividad antioxidante. Por otra parte, las proteínas y sus hidrolizados presentaron inhibición sobre la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I), mayor actividad en la muestra sin hidrolizar. Se concluyó que las proteínas del frijol ayocote pueden ser una alternativa para ser incorporadas en matrices alimentarias con el objetivo de mejorar sus propiedades físicas, además al presentar actividad biológica pueden ser incorporados en alimentos para atribuirles propiedades nutraceuticas.

Palabras clave: *Phaseolus coccineus*, proteínas, propiedades tecno-funcionales, hidrólisis enzimática, actividad antioxidante, actividad antihipertensiva.

GENERAL ABSTRACT

Currently, due to the increased knowledge and awareness of food ingredients and the preference to consume environmentally friendly foods, more people are choosing to consume plant-based proteins. Beans are considered an affordable alternative protein source with a full profile of amino acids, biological activity, and functional properties. However, no sufficient information on the proteins of the ayocote bean (*Phaseolus coccineus* L.) is available. Therefore, this paper aims to evaluate the techno-functional properties of the proteins of the ayocote bean and its biological activity, as well as its hydrolysates which were obtained by sequential hydrolysis with pepsin and pancreatin. As a result, the proteins exhibited foaming, emulsifying and gelling properties. A significant increase in the foaming capacity of heat-treated bean proteins was observed, while the emulsifying capacity was influenced by protein solubility. At pH 7, gel formation was observed with a minimum gelation concentration of 12 % (w/v). Proteins and their hydrolysates showed antioxidant activity on DPPH and ABTS radicals, with greater activity in bean hydrolysates that were subjected to heat treatment; likewise, all samples showed concentrations of phenolic compounds, which could have contributed to the antioxidant activity. On the other hand, the proteins and their hydrolysates showed inhibition of angiotensin I-converting enzyme (ACE-I), with greater activity in the unhydrolyzed sample. It was concluded that ayocote bean proteins can be an alternative to be incorporated in food matrices with the objective of improving their physical properties, in addition to presenting biological activity, they can be incorporated in foods to attribute nutraceutical properties to them.

Key words: *Phaseolus coccineus*, proteins, techno-functional properties, enzymatic hydrolysis, antioxidant activity, antihypertensive activity.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

México es considerado como el centro primario de domesticación y diversidad genética del frijol, y este, junto con el maíz, han sido la base de la alimentación de los mexicanos. Su valor nutricional se fundamenta principalmente en su alto contenido de proteínas (14 a 33%) y el valor biológico de las mismas (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2016).

A partir de los componentes de las proteínas, se obtienen moléculas nitrogenadas que permiten conservar la estructura y el crecimiento de los que las consumen, siempre y cuando sean consumidas en cantidades adecuadas y sean combinadas con otros elementos esenciales de la dieta, además, en lo que respecta a la agroindustria alimentaria estas destacan principalmente por sus propiedades funcionales, las cuales causan una mejora en las características del producto final (Badui, 2006; Quesada & Gómez, 2019; Jara-Romero et al., 2019).

En consecuencia, además de las propiedades nutricionales y funcionales de las proteínas, en la actualidad se ha optado por la obtención de péptidos bioactivos mediante hidrólisis enzimática (Martínez-Medina et al., 2019), los cuales son una secuencia de aminoácidos que se unen covalentemente a través de enlaces peptídicos (Yang et al., 2021) y cuyos efectos positivos en sistemas fisiológicos, como el sistema inmune, nervioso y sistema digestivo han sido demostrados, entre ellos los que presentan actividad antioxidante y los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I), la cual es precursora de la hipertensión arterial (Martínez-Medina et al., 2019),.

Existe evidencia científica que afirma que a través de los años se han buscado alternativas para disminuir el riesgo de la hipertensión arterial, sin embargo, a pesar de que se han obtenido diversos fármacos, estos han demostrado producir ciertas reacciones secundarias en el organismo, por lo que se han propuesto alternativas para inhibir a la ECA-I, como péptidos inhibidores de la ECA-I derivados de alimentos (Kamal, et al., 2021)

Por otra parte, existen enfermedades que se generan a través del estrés oxidativo de las células, tales como la aterosclerosis, artritis, diabetes, cáncer, entre otras (Sarmadi & Ismail, 2010), para prevenir dicha oxidación es necesario el consumo de alimentos que contengan agentes antioxidantes. Se ha encontrado que después de una reacción de hidrólisis sobre las proteínas, algunos péptidos bioactivos ejercen actividad antioxidante, este mecanismo lo adquieren debido a que en la ruptura de los enlaces peptídicos quedan expuestas las cadenas laterales de los aminoácidos más activos reduciendo así la oxidación (Yang et al., 2021).

En la actualidad, la principal fuente de extracción de los péptidos bioactivos con actividad biológica son los obtenidos a partir de las proteínas de origen animal, sin embargo su producción afecta considerablemente algunos recursos no renovables, aunado a lo anterior, el aumento de la población y las predicciones de este aumento hasta 9 mil millones de habitantes en el mundo en el 2050 ha generado cierta incertidumbre acerca de la mayor demanda en las proteínas, debido a que este es el segundo macronutriente de mayor importancia en la alimentación humana, por lo que cambiar los patrones de alimentación y consumir en menor cantidad proteínas de origen animal y reemplazarlas por proteínas de origen vegetal es una alternativa para reducir el impacto ambiental (Flachowsky, Meyer & Südekum, 2017; Kamal, et al., 2021).

Al respecto existe evidencia científica que afirma la obtención de péptidos con actividad biológica a partir de proteínas del frijol común, frijol lima, frijol bayo (Ciau-Solís et al., 2017; Schisano et al., 2019; Tovar-Benítez et al., 2020), sin embargo, no existe suficiente información acerca del frijol ayocote.

Hipótesis 1. Los aislados de proteínas de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) obtenidos poseerán propiedades tecno-funcionales.

Hipótesis 2. Los hidrolizados obtenidos a partir de aislados de proteína de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) mediante condiciones gastrointestinales simuladas, presentarán actividad antihipertensiva y antioxidante.

En consecuencia, para comprobar las hipótesis de esta investigación se plantearon como objetivos generales: a) Aislar proteínas de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) y evaluar sus propiedades tecno-funcionales y b) realizar una hidrólisis enzimática a las proteínas aisladas y evaluar su actividad antihipertensiva y antioxidante.

Para el cumplimiento del objetivo general, se plantearon como objetivos específicos: a) obtener harina de frijol ayocote (cruda y cocida), b) obtener extractos proteicos de las harinas, c) cuantificar y caracterizar las proteínas aisladas, d) evaluar las propiedades tecno-funcionales de las harinas y de las proteínas aisladas del frijol ayocote, e) realizar una hidrólisis enzimática bajo condiciones gastrointestinales simuladas en las proteínas aisladas, determinar su grado de hidrólisis y rendimiento, d) evaluar la actividad antihipertensiva y antioxidante de las proteínas aisladas y de los hidrolizados proteicos obtenidos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Leguminosas

Las leguminosas pertenecen a la familia de las *Fabaceae*, y se caracterizan principalmente por poseer su fruto en forma de legumbre. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), son el tercer grupo de plantas más numerosas que existen en el planeta y debido a su alto contenido en proteínas (14 a 33 %) y fibra (14 a 19 %), han sido la base de la alimentación humana en los países en vías de desarrollo (FAO, 2016). De las aproximadamente 150 especies destinadas para la alimentación animal y humana, los frijoles de *Phaseolus spp.* son de los más relevantes de acuerdo con el estándar de Codex Alimentarius (Olmedilla et al., 2010).

2.1.1 El frijol

El frijol es una planta herbácea de tallos delgados y débiles, cuadrangulares, hojas trifoliadas, ápice acuminado, laterales tubulosos, normalmente este alcanza una altura de 50 a 70 cm y sus raíces se desarrollan con una raíz pivotante principal y muchas ramificaciones, además su fruto es una vaina suavemente curvada y dehiscente cuando está madura, en su interior, las semillas pueden ser oblongas, ovales o redondeadas, dependiendo de la especie, poco comprimidas y de color café, negro, rojo moteadas (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [SAGARPA], 2017).

El frijol se originó y domesticó en América Latina, teniendo dos orígenes: Mesoamérica y los Andes hace aproximadamente 100, 000 años (Lara, 2015). Respecto a México, se sabe que este se domesticó de manera independiente hace aproximadamente 8000 años en el Valle de Tehuacán, Puebla (Hernández-López et al., 2013).

La importancia del cultivo de frijol (*Phaseolus spp.*) en el mundo, radica principalmente en su calidad nutricional, y su amplia distribución en todo el

planeta, esto debido a su adaptabilidad a los diversos climas, los diferentes métodos de cultivo, su amplio uso y su gran variabilidad morfológica (Broughton et al., 2003). En el año 2017, se reportaron 33.8 millones de hectáreas cultivadas en el mundo, concentrándose la mayor producción en seis países: India, Myanmar, Brasil, Estados Unidos, China y México (Fideicomisos Instituidos en Relación con la agricultura [FIRA], 2019).

Respecto a México, en el año 2018, el frijol ocupó la tercera posición en importancia por superficie sembrada (1.675 millones de hectáreas), después del maíz, los pastos y las praderas, considerándose como una especie de importancia económica para el país debido a que ocupó la 13va posición en el valor de la producción agrícola nacional, con una participación del 2.1 %, misma que ha presentado un crecimiento de 4.6 % en promedio anual, (1.1 millones de toneladas) (Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria [CDRSSA], 2020).

De las 150 especies de frijol destinadas al consumo animal y humano, 70 han sido reportadas en nuestro país, de las cuales solo cinco han sido domesticadas: frijol común (*P. vulgaris*), frijol lima (*P. lunatus* L.), frijol ayocote (*P. coccineus* L.), frijol tepary (*P. acutifolius* Gray) y frijol petaco (*P. polyanthus* Green) (Ruíz, 2009), entre estos, los más consumidos en el país son el frijol común y el frijol ayocote, sin embargo, el fitomejoramiento se ha enfocado en el frijol común (FIRA, 2016).

Respecto al consumo per cápita del frijol, en el año 2019 se registró un consumo promedio de 7 kg por persona al año, comparado con años anteriores (2012; 11 kg), se ha observado una disminución considerable (CEDRSSA, 2020), la cual se atribuye a la migración, urbanismo, cambios en el poder adquisitivo de la población en general y la mayor incorporación de la mujer en el campo laboral (FIRA, 2016). Respecto a las preferencias de consumo, se seccionan de la siguiente manera: parte norte y noroeste; pinto y azufrado, parte centro; flor de mayo y flor de junio, y parte sur y sureste; negro (CEDRSSA, 2020).

2.1.2 Frijol ayocote

El frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*) es originario de las partes altas de Mesoamérica y ha sido domesticado desde hace aproximadamente 2200 años en el Valle de Tehuacán, Puebla (Salinas, 1988; Vargas-Vázquez et al., 2011). En México, se cultiva como una planta anual o bianual y puede sembrarse en monocultivo o asociado con maíz, árboles frutales o incluso con otras especies de frijol (Vargas-Vázquez et al., 2011). Este es considerado como una planta de altura debido a que se han encontrado colectas de esta leguminosa en altitudes de entre los 1400 a 2600 metros sobre el nivel del mar (msnm) (Vargas-Vázquez et al., 2012).

López et al. (2005), mencionan que es una de las especies que se adaptan a un mayor número de tipos climáticos y a un mayor intervalo climático del territorio nacional (templado, cálido y semicálido, árido y semiárido, semifrío y frío). Además, se ha reportado que, en comparación con el frijol común, tiene mayor resistencia a ciertas enfermedades como el virus del mosaico común, virus del mosaico dorado, tizón de halo (*Pseudomonas syringae* Van Mall), tizón común (*Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* Smith), entre otras (Ruiz-Salazar et al., 2021).

Se ha reportado que el frijol ayocote es la segunda especie más consumida en México, principalmente en el centro del país en donde se concentra al menos un tercio de la población nacional, del cual, muchos de ellos son migrantes de los estados donde se cultiva, principalmente Puebla y Veracruz, sin embargo, no se ha considerado en las estadísticas oficiales debido a que la superficie sembrada y la producción total se incluye en las cifras del frijol común, lo anterior es debido a las preferencias de los consumidores, los cuales no se basan en la especie sino principalmente en el color o tipo de grano, cabe mencionar que en las regiones donde se cultiva, su uso es principalmente para autoconsumo y como máximo se oferta en mercados ambulantes o tianguis (Ruíz-Salazar et al., 2021).

2.1.3 Importancia del frijol en la alimentación

El frijol en México es considerado uno de los alimentos más nutritivos, debido a la gran cantidad de macro y micronutrientes que aporta, demostrando que juega un papel muy importante en la salud de los mexicanos (Gálvez & Salinas, 2015), esto principalmente en las regiones de mayor marginación, las cuales no tienen acceso a alimentos de mayor costo, como productos de origen animal que aportan cantidades significativas de proteínas, macronutrientes de gran importancia en la alimentación humana (Jacinto-Hernández et al., 2019).

El frijol ayocote posee entre 15 - 24 % de proteínas, 68% de carbohidratos, siendo el almidón el componente mayoritario en esta leguminosa, así mismo, el contenido en lípidos oscila entre 1.6 - 3.8 %, mientras que el contenido de minerales se encuentra entre 3.5 - 3.8 %, siendo los principales el sodio (12 mg), potasio (1.3 mg), calcio (116 mg), hierro (5.9 mg) y zinc (2.8 mg) (Reyes et al., 2008; Teniente-Martínez, González, Cariño-Cortés & Bernardino-Nicanor, 2016.).

En el Cuadro 1 se observa la composición química de diferentes especies de frijol, la variación en cada especie puede ser debido a diversos factores como: la variedad, localización geográfica, condiciones de crecimiento, entre otros (Bolaños, 2011). Indiscutiblemente, el frijol en general conforma la base de la alimentación en México debido a su alto contenido de proteínas y el valor biológico de las mismas.

Cuadro 1. Composición química de diferentes especies de leguminosas

Leguminosa	<i>P. coccineus</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. lunatus</i>	<i>V. umbellata</i>	<i>Cajanus cajan</i>
Proteína	18.9	23.32	24.8	22.42	19.93
Lípidos	1.6	3.53	2.3	0.1758	1.06
Fibra	6.9	3.66	5.5	4.20	8.68
Cenizas	4.0	4.60	4.2	4.13	2.89
Carbohidratos	67	NR	63.3	69.07	NR

Fuente	Alvarado-López et al., 2019	Siddiq et al., 2010	Pérez-Navarrete et al., 2006	García-Alanís et al., 2019	García et al., 2012
--------	-----------------------------	---------------------	------------------------------	----------------------------	---------------------

NR: no reportados

2.2 Concepto general de proteínas

Las proteínas son biomoléculas conformadas por una secuencia de aminoácidos (moléculas compuestas por un grupo amino y ácido carboxílico), la unión de dichos aminoácidos es posible a través de un enlace peptídico, en donde el grupo carboxílico del aminoácido y el grupo amino de otro se unen a través de un enlace covalente con la pérdida de una molécula de agua, el producto de tal unión es un dipéptido, posteriormente, el grupo carboxilo libre del dipéptido reacciona de manera similar con el grupo amino de un tercer aminoácido y así sucesivamente (Badui, 2006).

A los aminoácidos modificados después de la síntesis de la proteína se les denomina residuos de aminoácidos, la unión de un bajo número de aminoácidos da lugar a un péptido, por lo que si el número de residuos de aminoácidos es menor a 10 se le denomina oligopéptido, si es superior a 10 se le llama polipéptido y si el número es superior a 50 se le considera bajo el término de proteínas (Guillén, 2009).

La secuencia de aminoácidos y su estructura les confiere a las proteínas diferentes propiedades fisicoquímicas, además de una actividad biológica específica, ya sea de estructura, enzima, hormonas, transportadores, mensajeros, componentes del sistema inmune; entre otras (Quezada y Gómez, 2019).

2.2.1 Estructura de las proteínas

La estructura de las proteínas se clasifica en cuatro niveles diferentes (Guillén, 2009).

- Primaria: determinada por el número y secuencia de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos.

- Secundaria: la cadena principal de la proteína adoptar múltiples conformaciones en el espacio formadas mediante el plegamiento por repulsión de los aminoácidos hidrofóbicos, la atracción de aminoácidos cargados, la formación de puentes disulfuro o por la ayuda de otras proteínas.
- Terciaria: proteínas enrolladas que adoptando diferentes posiciones en el espacio.
- Cuaternarias: proteínas multiméricas mayores, formadas a partir de proteínas agrupadas en varias cadenas polipeptídicas (o monómeros).

2.2.2 Importancia de las proteínas

Las proteínas poseen propiedades nutricionales, por su aporte de aminoácidos y de sus componentes, en consecuencia sus moléculas nitrogenadas permiten un óptimo funcionamiento del organismo; así mismo, pueden ser ingredientes de productos alimenticios y, por sus propiedades funcionales, ayudan a establecer la estructura y propiedades finales de diversos sistemas alimenticios (Quezada y Gómez, 2019; Jara-Romero et al., 2019).

El valor biológico de las proteínas depende fundamentalmente de su composición de nueve aminoácidos esenciales (Martínez & Martínez, 2006), siendo entonces, el frijol ayocote uno de los alimentos con gran valor proteico al contener estos aminoácidos esenciales (valina, isoleucina, treonina, fenilalanina, leucina, lisina y menor cantidad triptófano, metionina y cisteína) (Estrada, Álvarez, Acosta, Bravo-Delgado y Altamirano-Fortoul, 2019), superando los valores de requerimientos diarios recomendados por la FAO (Cuadro 2).

Cuadro 2. Perfil de aminoácidos en harina de frijol ayocote

Aminoácidos No esenciales	g/100 de proteína de frijol ayocote	g FAO/OMS/ UNU *	aminoácidos Esenciales	g/100 de proteína de frijol ayocote	g FAO/OMS/ UNU *
Triptófano	0.554	0.90	Acido aspártico	12.061	0.90

Valina	5.537	1.80	Serina	6.312	0.50
Isoleucina	4.412	1.30	Ácido glutámico	14.587	1.80
Treonina	4.775	0.90	Prolina	4.082	0.60
Fenilalanina	5.875	1.90	Glicina	4.208	0.20
Leucina	8.388	1.90	Alanina	4.746	0.30
Lisina	10.404	1.60	Tirosina	3.075	0.50
Histidina	3.861	1.60	Arginina	5.669	0.50
Metionina+Cistienina	3.307	1.70			

Fuente: Estrada et al., 2018.

* (FAO/OMS/UNU, 1985).

2.2.3 Proteínas de origen vegetal

El creciente aumento de la población y las predicciones de aumento hasta 9 mil millones de habitantes en el mundo en el 2050 ha generado cierta incertidumbre acerca de la mayor demanda en las proteínas debido a que este es el segundo macronutriente de mayor importancia en la alimentación humana, debido a que actualmente las fuentes tradicionales de proteínas son las de origen animal, sin embargo, estas requieren una gran cantidad de tierra cultivable (115 millones de hectáreas) en comparación con la producción agrícola (45.5 millones) (Flachowsky et al., 2017; Quezada y Gómez, 2019; Torres y Rojas, 2019), además, el consumo de alimentos cárnicos trae consigo un uso mucho mayor de agua que el de vegetales, por el ejemplo, producir un kg de carne vacuno requiere el uso de 15, 400 litros de agua en comparación de 4,100 litros por cada kg de leguminosas (Mena Roa, 2022).

Se ha estimado que, en el año 2050, la cantidad de cultivos dado para el consumo del ganado podría exceder la utilizada para humanos, además, el creciente número de unidades ganaderas puede generar una mala calidad del agua potable resultado de la lixiviación de nitrato en las aguas subterráneas y los ríos, así como la calidad del aire como resultado de las emisiones de amoníaco a la atmósfera (Wilkinson & Lee, 2018).

Una alternativa que actualmente representa una solución para cubrir con la demanda de proteínas, son las proteínas de origen vegetal, debido a su accesibilidad, menores costos y adaptabilidad a condiciones edafoclimáticas extremas en muchas partes del mundo (Sim et al., 2021).

2.2.4 Digestibilidad de las proteínas

La digestibilidad de las proteínas de los alimentos se define como la relación entre el nitrógeno consumido respecto al absorbido. Se considera una digestibilidad igual a 100 cuando la totalidad del nitrógeno ingerido es totalmente absorbido. Por consiguiente, evaluar dicho parámetro es útil para determinar la cantidad que se precisa para proporcionar una tasa de aminoácidos esenciales que asegure el crecimiento y el mantenimiento y para conocer los cambios del valor nutritivo de las proteínas durante el procesado, de manera que se puedan elegir condiciones que reduzcan las pérdidas de calidad (Fennema, 2000).

La digestibilidad de las proteínas se puede determinar por varios métodos, entre los cuales se encuentran, la digestibilidad *in vivo*, aparente o verdadera, directa o indirecta, sin embargo, estas presentan algunos inconvenientes como el tiempo de ejecución, la cantidad de alimento empleado, el costo y el manejo de animales (Malca, Lucas, Arbaiza, Carcelén & San Martín, 2006). Por otra parte, se emplean métodos enzimáticos para evaluar la digestibilidad *in vitro*, ya sea por la disminución de pH después de la adición de una mezcla enzimática o bien, por la cantidad de NaOH requerida para mantener constante el valor del pH durante una digestión desarrollada a nivel laboratorio (Badui, 2006).

2.2.5 Propiedades tecno-funcionales de las proteínas

La importancia de las proteínas en la industria alimentaria radica principalmente en sus propiedades tecno-funcionales, las cuales proporcionan información acerca de su comportamiento dentro de múltiples sistemas alimenticios y son afectadas principalmente cuando estas son sometidas a diferentes tratamientos térmicos, físicos, químicos entre otros; provocando alteraciones en su estructura

y en la desnaturalización de las mismas (Pacheco, Mercado, Santos & Arrieta, 2019), dichas propiedades están determinadas por sus características de hidratación (solubilidad, absorción y retención de agua), de superficie (capacidad espumante y emulsificante) y su comportamiento reológico (gelificación y viscosidad) (Allende, 2016).

Capacidad de formación de espuma

Las espumas consisten en una fase continua acuosa y una fase dispersa gaseosa, generalmente sirve para formar y estabilizar diversos alimentos, a partir del batido, burbujeo o agitación de la solución proteica, en su superficie tienen la capacidad de adsorberse rápidamente en una interfase, este fenómeno ocurre debido a la estructura que presentan, la cual permite el despliegue fácilmente y la reorientación a una nueva interfase formándose una película viscoelástica cohesiva a través de interacciones intermoleculares (Amagliani et al., 2017)

La capacidad de formación de espuma de las proteínas representa el aumento relativo en el volumen de la solución proteica resultante de la incorporación de aire y se expresan como sobre rendimiento o poder de espumado (Jarpa-Parra., 2017), mientras que la estabilidad de espuma se refiere a la capacidad que tienen las proteínas para estabilizar la espuma contra la gravedad y tensiones mecánicas (Amagliani et al., 2017) Factores como el pH, sales, azúcares, lípidos, concentración de proteína y temperatura afecta considerablemente la estabilidad.

Capacidad emulsionante

Las proteínas, debido a sus propiedades anfifílicas, presentan gran importancia en la industria alimentaria para la formación de emulsiones (Jara-Romero et al., 2019), lo anterior a través de sus grupos sulfhidrilo y disulfuro, los cuales promueven la polimerización por los cambios conformacionales en la proteína mediante una reacción de intercambio sulfhidrilo-disulfuro, lo que produce que la proteína se adsorba irreversiblemente a la interfaz desarrollando la formación de una película altamente viscosa y alrededor de las gotitas a partir de interacciones

no covalentes, formadas por el esfuerzo mecánico que evitan la coalescencia y floculación, mejorando así la dispersión de estas y generando estabilidad en las emulsiones (Jarpa-Parra, 2017).

Factores como las características estructurales y químicas, el grado de hidrólisis, el contenido y arreglo de aminoácidos, el peso molecular, las regiones hidrofóbicas y las condiciones del medio como la temperatura, el pH y efectos iónicos son de vital importancia para el desarrollo oportuno de la capacidad emulsionante de las proteínas de las proteínas (Aguilar-Raymundo & Vélez-Ruiz, 2013).

Capacidad de retención de agua y aceite

Las proteínas tienen la capacidad de retener agua y aceite debido su composición de aminoácidos, la conformación estructural y la polaridad/hidrofobicidad de la superficie (Lafarga, Álvarez, Villaró, Bobo & Aguiló-Aguayo, 2019).

La capacidad de retención de agua se establece mediante interacciones ion-dipolo, así mismo, se unen al esqueleto del enlace peptídico, a los grupos amida de Asn y Gln, y al grupo hidroxilo de los residuos Ser, Thr y Tyr por interacciones dipolo-dipolo y su importancia radica en que estas pueden utilizarse en alimentos viscosos proporcionando cuerpo, espesamiento y viscosidad al mismo (Du et al., 2018).

Por otra parte, la capacidad para retener aceite se debe principalmente a las interacciones que ocurren a partir de enlaces hidrofóbicos, electrostáticos, no covalentes y puentes de hidrógeno que se da entre proteínas y lípidos (Avanza et al., 2012), por lo que generalmente las proteínas con mayor cantidad de residuos de aminoácidos hidrofóbicos y no polares poseen mejor capacidad de retención de aceite (Tan et al., 2016), lo que es deseable en la industria alimentaria debido a que retiene mejor el sabor y mejoran su palatabilidad, además de que son valores indicativos de una buena capacidad emulsificante (Lafarga et al., 2019).

Capacidad gelificante

Un gel es un sólido compuesto de al menos dos componentes, uno de los cuales (polímero) forma una red tridimensional en virtud de enlaces covalentes o no covalentes (geles químicos y físicos, respectivamente) en el medio del otro componente (líquido), en el que la cantidad mínima del líquido es suficiente para garantizar las propiedades elásticas del gel (Rogovina et al., 2008)

La gelificación de las proteínas se induce a partir del calentamiento, que produce diversas reacciones como desnaturalización y desdoblamiento, disociación, asociación y agregación de las proteínas (Xia, Siu & Sagis, 2021).

Por lo tanto, la formación de un gel proteico consiste en el despliegue de la proteína a partir de una desnaturalización térmica, en donde la conformación de la proteína nativa se desdobra (exponiendo así los grupos funcionales sulfhidrilo o hidrófobos) y ocurre una agregación debido a la formación de enlaces disulfuro e interacciones hidrofóbicas entre estos grupos, una vez que la concentración de proteína está por encima de su punto crítico de gelificación, la agregación da lugar a la formación de una estructura de gel (Batista, Portugal, Sousa, Crespo & Raymundo, 2005).

Existen diversos factores que controlan las propiedades de gelificación de las proteínas, tales como la capacidad de los polipéptidos para interactuar entre sí después del tratamiento térmico a través de enlaces covalentes (enlaces disulfuro y ditirosina, puentes de hidrógeno, atracciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas), así mismo la secuencia y composición de aminoácidos, la estructura y condiciones del medio como concentración de proteína, pH, concentración iónica y tratamiento térmico (Al-Ali et al., 2021).

2.3 Hidrólisis de proteínas

Los hidrolizados de proteínas son un conjunto de péptidos que poseen diferentes tamaños, los cuales son obtenidos a partir de la hidrólisis de proteínas, catalizada por agentes químicos o por enzimas. Los métodos convencionales para la

obtención de péptidos son: hidrólisis química, microbiana y enzimática (Ulug et al., 2021), de las cuales, la hidrólisis enzimática es la que presenta más ventajas (Cuadro 3).

2.3.1 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de proteínas consiste en la ruptura de los enlaces peptídicos que estructuran las cadenas proteicas, catalizada por enzimas, consumiéndose una molécula de agua en el ataque nucleofílico por cada enlace roto, lo que provoca la obtención de péptidos con un grupo amino y carboxilo en sus cadenas laterales (Figuerola et al., 2012).

Factores que influyen en la hidrólisis enzimática

Para la mejora del rendimiento, la composición y la actividad funcional de los péptidos obtenidos en la hidrólisis enzimática, existen factores que deben ser controlados, como especificidad de la enzima, tiempo de hidrólisis, relación de enzima-sustrato, pH, temperatura y concentración del sustrato (Yang et al., 2021).

Cuadro 3. Método para la obtención de péptidos

Método	Ventajas	Desventajas	Referencias
Químico Uso de ácidos y álcalis que rompen enlaces peptídicos para la obtención de péptidos y aminoácidos	Método fácil y económico	Destrucción de los aminoácidos serina y treonina. Cambios estructurales de la cisteína y metionina. Producción del derivado de lisinoalanina indeseable en alimentos. No es amigable con el medio ambiente.	Nasri, (2017); Mustăţea et al., (2019); Ulug et al., (2021) Yang et al., (2021); Chai et al., (2020).
Microbiano Uso de microorganismos responsables de sintetizar enzimas que hidrolizan a las proteínas para la obtención de péptidos	Péptidos obtenidos en alimentos de ingesta directa, no es necesaria su purificación. Se puede realizar en alimentos en estado sólido o líquido.	Es difícil controlar los péptidos a obtener.	

Enzimático Uso de enzimas proteolíticas que hidrolizan enlaces peptídicos de las proteínas para la obtención de péptidos	Bajos costos de producción Alta especificidad. Alta eficiencia catalítica Alto rendimiento del producto. Escalabilidad Ausencia de productos químicos tóxicos Producción a gran escala. Estabilidad en el proceso. Aprovechamiento de subproductos alimentarios. Uso de menos energía. Condiciones de pH y temperatura menos drásticas.	Bajos rendimientos.	Yang et al., (2021); Ulug et al., (2021); Wang & Lü, (2021); Bhandari et al., (2019).
--	--	----------------------------	--

pH

Además de la selección correcta de la enzima a utilizar, se debe considerar el pH óptimo de la enzima, de manera que esta pueda efectuar su función. La actividad enzimática depende fuertemente del pH, debido a que los iones hidronio que se encuentran en el medio ionizan a los aminoácidos de la enzima, incluyendo aquellos que conforman al sitio activo; al sustrato o al complejo enzima-sustrato, así mismo, el pH influye sobre la estructura de la proteína y la afinidad de la enzima sobre el sustrato (Aluko, 2015).

Temperatura

La temperatura ejerce un efecto sobre cualquier proceso químico o bioquímico que se desarrolla, puesto que al aumentar la temperatura la energía cinética de las moléculas también aumenta. Respecto a las enzimas, la reacción de estas aumenta conforme aumenta la temperatura, sin embargo, debido a su naturaleza proteica, estas tienen una estructura tridimensional globular y solo presentan actividad cuando tienen una conformación espacial que permite establecer una disposición óptima de los aminoácidos de su centro activo o su sitio catalítico, por lo que, al aumentar en extremo la temperatura, se pierde su estructura terciaria y su capacidad catalítica (Zapata et al., 2019; Badui, 2006).

Relación enzima sustrato

El sustrato que se emplea en la hidrólisis enzimática puede ser de origen animal, vegetal o microbiano, la elección de uno de estos es influenciada por el uso que se le desee dar al producto final (Nasri, 2017).

La concentración de sustrato que se agregará al medio debe ser más alta en relación con la concentración de las enzimas, mayores concentraciones de sustrato aumentan la velocidad de la reacción de las enzimas debido a que todas las moléculas se encuentran saturadas alcanzando su máxima velocidad de reacción (Yang, 2019).

Tiempo

El tiempo de reacción de la hidrólisis influirá de manera directa en el grado de hidrólisis final. A medida que el tiempo de reacción aumente, los enlaces peptídicos estarán más expuestos y se generarán péptidos de menor peso molecular. Generalmente, los péptidos con actividad biológica se obtienen a partir de péptidos de menor peso molecular, por lo que, tiempos de hidrólisis prolongados puede mejorar las propiedades biológicas de dichos péptidos, sin embargo, se ha demostrado que algunas propiedades tecno-funcionales se ven afectadas (Flores et al., 2020)

2.3.2 Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis es la propiedad fundamental de un hidrolizado y va a determinar en gran medida las características restantes del mismo, por tanto, su posible uso. Se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación con la proteína original (Benítez et al., 2008). Su medición puede realizarse por diferentes métodos, cuyo fundamento es la determinación de nitrógeno soluble tras precipitar la proteína con ácido tricloroacético, la determinación de los grupos α -amino libres y la valoración del protón liberado tras la ruptura de un enlace peptídico a determinados valores de pH (Benítez et al., 2008).

Los hidrolizados con un grado de hidrólisis menor del 10 % se emplean principalmente para la mejora de propiedades funcionales, esto debido a que, con la ruptura de los enlaces peptídicos, quedan expuestos grupos hidrofóbicos, permitiendo así la mejora de las propiedades funcionales como la solubilidad, la capacidad emulsionante, la capacidad espumante, entre otras. Por otra parte, cuando el grado de hidrólisis es mayor al 10 % los péptidos resultantes se utilizan para una alimentación especializada (Benítez et al., 2008).

2.4 Actividad biológica de péptidos

El efecto biológico de los péptidos depende de su disponibilidad, la cual está determinada por su resistencia a la digestión gastrointestinal (Segura-Campos et al., 2010). Diversos estudios han demostrado efectos positivos en sistemas

fisiológicos, como en el sistema inmune, nervioso y digestivo (Martínez-Medina et al., 2019).

Los péptidos con actividad biológica que se han estudiado son: inmunomoduladores, antihipertensivos (inhibidores de la ECA-I), antioxidantes, reguladores del tránsito intestinal, reductores de la proliferación de tumores cancerígenos, antimicrobianos, hipocolesterolémicos y por último anticoagulantes (Galicia et al., 2013).

2.4.1 Actividad antihipertensiva

La hipertensión arterial es una enfermedad relacionada con el aumento de la presión que ejerce la sangre bombeada por el corazón sobre los vasos sanguíneos que producen daño en las arterias y parénquima, la cual es causada por factores como tabaquismo, alta ingesta de sodio y alcohol e inactividad física contribuyendo en un 12.8 % de la mortalidad por todas las causas, siendo en el 2019 la causante de 10.8 millones de muertes, prevaleciendo principalmente en países en vías de desarrollo, entre los cuales se encuentra México (Campos-Nonato et al., 2021).

Por otra parte, el sistema renina-angiotensina (SRA) es uno de los sistemas de regulación central de la presión arterial sanguínea, dicho sistema estimula la activación simpática de secreción de la enzima renina en el riñón (Torruco-Uco et al., 2008) sin embargo, aunque el origen de la enzima renina es renal, su precursor, la pro-renina se sintetiza en diversos órganos, como hígado, suprarrenal, aorta, corazón o testículos.

La pro-renina se puede activar y convertir en renina mediante un proceso proteolítico o no proteolítico, el primero es irreversible y ocasiona el desprendimiento del propéptido que cubre la hendidura catalítica, este se produce en el riñón por acción de agentes endógenos o exógenos como la catepsina B, la catepsina-1 y la proconvertasa, mientras que la activación no proteolítica es producida por cambios de pH o temperatura en el medio, este proceso ocurre en dos pasos, el primero se produce la exteriorización del

propéptido descubriendo el sitio activo y en el segundo la molécula de renina adopta una conformación enzimáticamente activa (Morales & Estañ, 2010).

La enzima renina producida, reacciona con el angiotensinógeno (Ao), glicoproteína con un peso molecular de entre 62 000 a 65 000 Da producido en el hígado (Wagner, 2018), dando lugar al decapeptido angiotensina I (Ang-I), a su vez, la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I) o kininasa II que es un dipeptidil carboxipeptidasa I, (kininasa II, EC 3,4,15,1) zinc metalopeptidasa, sintetizada en el pulmón, rompe el dipéptido del C-Terminal de la Ang-I convirtiéndola en angiotensina-II (Ang-II), potente vasoconstrictor que actúa directamente sobre las células del músculo liso vascular y sobre el sistema nervioso simpático tanto periférica como centralmente para aumentar el tono vascular (Figura 1) (Torruco-Uco et al., 2008).

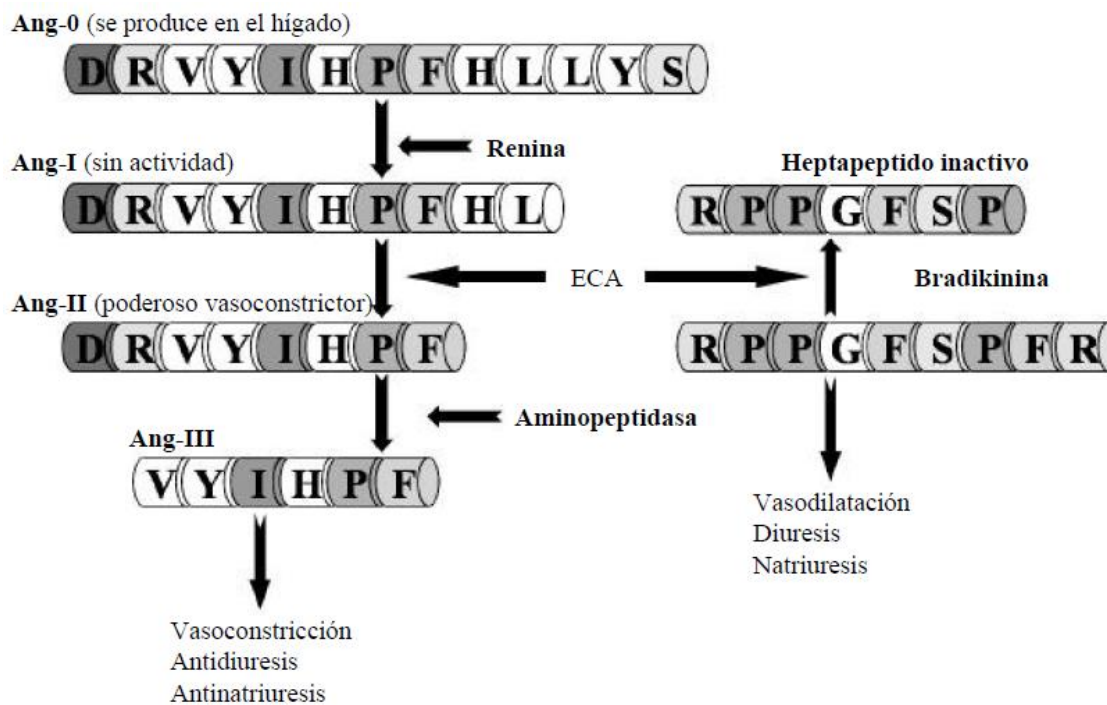


Figura 1. Modelo del sistema renina-angiotensina (SRA) (De la Serna, 2006).

Actualmente, el estudio sobre el mecanismo antihipertensivo se ha enfocado en la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I) (Mulero, Zafrilla,

Martínez-Cachá, Leal & Abellán, 2011), siendo el pionero el Captopril®, sintetizado por Ondetti, Rubin y Cushman (1977), sin embargo, se ha demostrado que dichos fármacos producen reacciones secundarias en el organismo, debido a ello, se han propuesto otras alternativas para inhibir a esta enzima (Kamal, et al., 2021).

Actualmente, las proteínas de origen vegetal han tomado gran interés debido a que se ha demostrado que presentan actividad antihipertensiva, siendo las más estudiadas el frijol mungo, arroz, garbanzo, frijol caupí, maní, amaranto, entre otros después de haberles aplicado una reacción de hidrólisis enzimática.

Se han hecho estudios sobre la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I) de proteínas algunas leguminosas y sus hidrolizados. Schisano et al. (2019) trabajaron con proteínas aisladas de diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris* encontrando inhibición sobre la ECA-I en un rango de 54 – 62 %, así mismo, Boschín et al. (2014) evaluaron proteínas de diferentes leguminosas después de haberles aplicado una hidrólisis enzimática secuencial de Pepsina-Pancreatina encontrando diferentes porcentajes de inhibición de la ECA-I en *Cicer arietinum* (86 %), *Lens culinaris* (79 %), *Lupinus angustifolius* (89 %), *Lupinus albus* (80 %), *Phaseolus vulgaris* (77 %), *Pisum sativum* (71 %) y *Glycine max* (88 %), mientras que Ciau-Solís et al. (2017) reportaron porcentaje de inhibición más bajo (10.53 %) en proteínas hidrolizadas con pepsina-pancreatina de *Phaseolus lunatus* L.

La actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina va a estar determinada principalmente por el tipo de aminoácidos y la secuencia de estos en los péptidos. Se ha encontrado que la mayoría de los péptidos que poseen esta actividad tienen secuencias que van de 2 a 10 aminoácidos, siendo los péptidos que poseen mayor actividad aquellos que tienen aminoácidos hidrófobos como Pro, especialmente, en el C-terminal o aminoácidos cargados positivamente como Lys o Arg en la posición del C-terminal. (García et al., 2013).

Metodologías para determinar la actividad antihipertensiva

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antihipertensiva en péptidos bioactivos, entre ellos: cromatografía de fase reversa y cromatografía líquida de ultra rendimiento-espectrometría de masas (UPLC-MS) (García et al., 2013).

Sin embargo, el método más utilizado es el reportado por Cushman y Cheung, (1971), método espectrofotométrico cuyo reactivo principal es el hipuril histidil leucina (HHL), el cual se hidroliza por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), generando como productos liberados el ácido hipúrico (HA) y el HHL.

2.4.2 Actividad antioxidante

Radicales libres

Tanto en el organismo como en los alimentos se generan radicales libres (RL), moléculas que presentan al menos un electrón desapareado en su orbital más extremo, estos al ser muy inestables y con una alta reactividad reaccionan fácilmente con otras moléculas que se encuentran en el medio consiguiendo así el apareamiento de sus electrones, como resultado se libera una reacción en cadena en el medio que ocasiona estrés oxidativo. Aunado a lo anterior, existen dos grupos de radicales libres: a) especies reactivas de oxígeno (ROS) estos son el radical hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$), anión superóxido ($\text{O}_2^\cdot$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y b) especies reactivas de nitrógeno (ERN) que se conocen como radical óxido nítrico ($\text{NO}^\cdot$) y peroxinitrito ($\text{OONO}^\cdot$) (Vargas et al., 2007) (Figura 2).

Cabe mencionar que los RL no son esencialmente dañinos si el organismo los produce en cantidades moderadas, debido a que son neutralizados fácilmente por el sistema de desintoxicación con que cuenta, a través de enzimas encargadas de dicha neutralización (Hernández et al., 2020), sin embargo, cuando se producen radicales libres debido a factores como contaminantes que se encuentran en el aire, oxidantes del tabaco, la radiación ultravioleta, entre otros, pueden ser motivo de diversas enfermedades como aterosclerosis, artritis, diabetes, cáncer, entre otras (Sánchez-Valle & Méndez-Sánchez, 2013) (Figura 3).

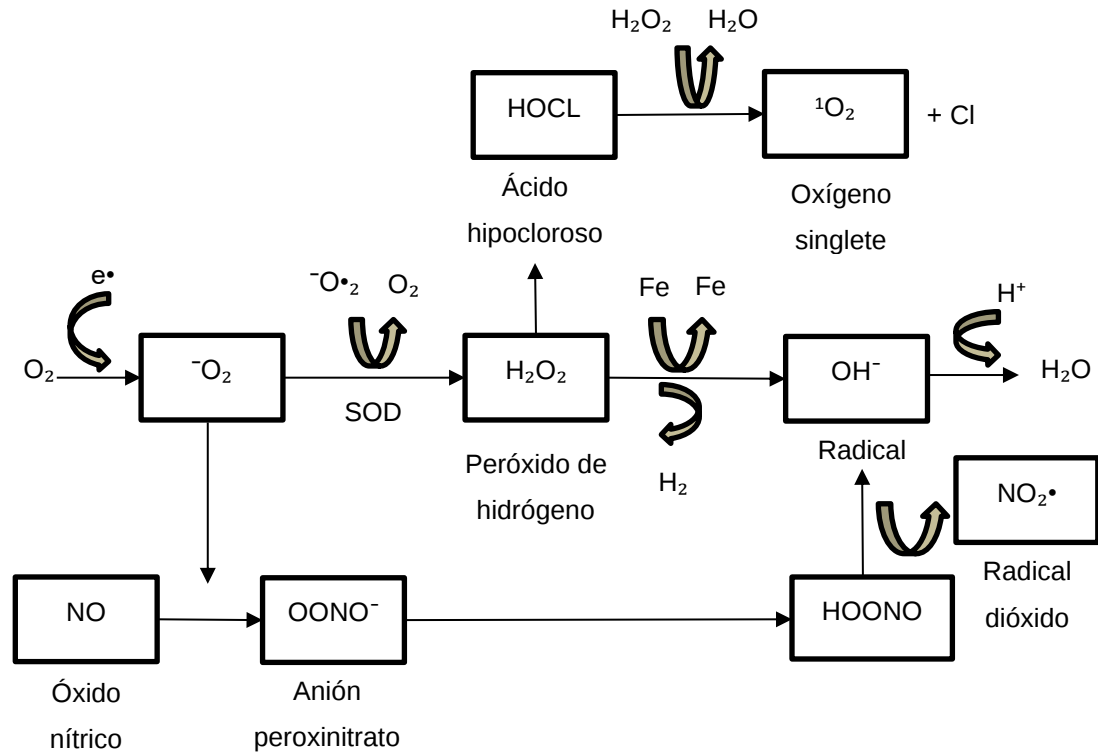


Figura 2. Esquema de la generación de ERO y ERN (Vargas et al., 2007)

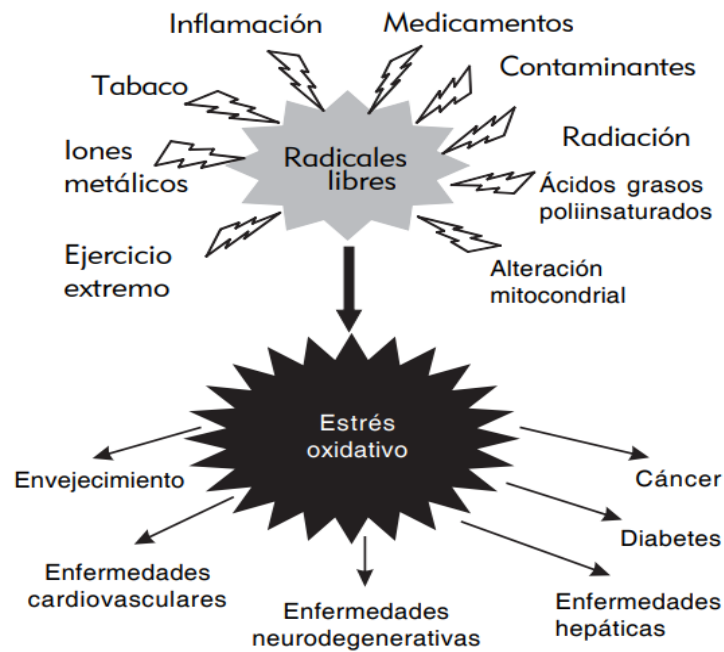


Figura 3. Esquema de la generación exógena de radicales libres y efectos adversos del estrés oxidativo en la patogénesis de enfermedades (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013).

El estrés oxidativo es un factor muy importante en la acumulación de moléculas oxidadas durante el proceso de envejecimiento el cual afecta a todas las células, principalmente a los sistemas nervioso, endócrino e inmunológico, así como la comunicación entre ellos (Rico-Rosillo et al., 2016).

Antioxidantes

Para proteger al organismo de los radicales libres, las células y los órganos del cuerpo tienen sistemas antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) y no enzimáticos (vitaminas, oligoelementos, coenzimas y cofactores), un grupo de sustancias que, en bajas concentraciones con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen su oxidación (Sarmadi y Ismail, 2010), su modo de acción es impedir que otras moléculas se unan al oxígeno, evitando así las alteraciones de moléculas, como lípidos, proteínas, ADN, entre otros, que son funcionalmente vitales, sin embargo, cuando la concentración de RL es excedente, es necesaria la ingesta de estos a través de alimentos que los contengan (Coronado et al., 2015).

Mecanismos de acción de los antioxidantes

Los mecanismos de acción de los antioxidantes se han clasificado en tres sistemas principales: la neutralización de los radicales libres mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno (TAH) y/o mediante la transferencia de un solo electrón (TSE) y la neutralización de catalizadores prooxidantes mediante la quelación de metales de transición, lo que conduce a complejos compuestos (Zeb, 2020).

Transferencia de átomos de hidrógeno (TAH)

En TAH, el antioxidante que contiene un átomo de H representado por ArOH reacciona con los radicales libres (R), transfiriéndole un átomo de hidrógeno, mediante la ruptura homolítica del enlace O-H. El radical libre se estabiliza para formar una especie neutra (RH), mientras que el antioxidante se convierte en antioxidante radical libre (ArO) (Leopoldini et al., 2011) (Figura 4). La donación

de un átomo de hidrógeno por un antioxidante se explica por el potencial de reducción (Zeb, 2020).

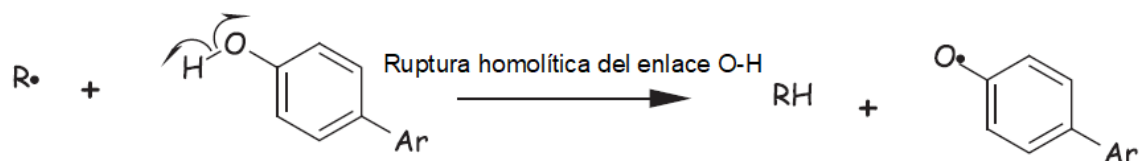


Figura 4. Mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno (TAH). (Fuente: Leopoldini et al., 2011).

Transferencia de un solo electrón

En el mecanismo de transferencia de un solo electrón (TSE), el R (anión) formado es una especie energéticamente estable que tiene un número par de electrones, mientras que ArOH (el radical catiónico) es una especie de radical menos reactiva y, por lo tanto, estable (Leopoldini et al., 2011). El número impar de electrones formado por las reacciones con el radical en $\text{ArOH}^{+\bullet}$ es una estructura de anillo aromático que posee la posibilidad de distribuirse por toda la molécula (Rhile et al., 2006). Esto da como resultado una estabilización radical de la molécula antioxidante (Figura 5).

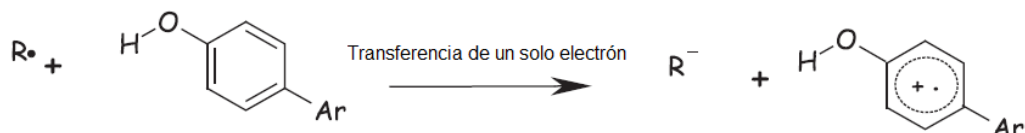


Figura 5. Mecanismo de transferencia de un solo electrón (TSE) (Fuente: Leopoldini et al., 2011).

Quelación de metales de transición

La quelación de metales de transición es una de las funciones antioxidantes que puede desempeñar un compuesto fenólico. Diversos estudios han demostrado que los metales de transición quelados por los polifenoles forman productos estables, en forma de complejos estables (Van Acker et al., 1996, Zeb, 2020) (Figura 6).

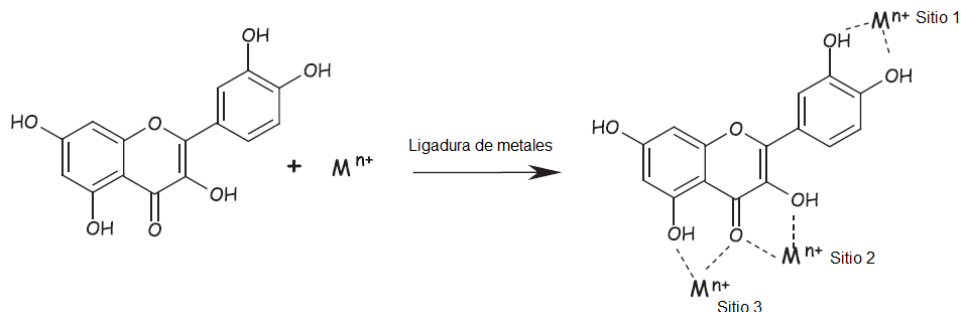


Figura 6. Mecanismo de quelación de metales de transición (QMT) (Fuente: Leopoldini et al., 2011).

Medición de la actividad antioxidante

Determinación de la actividad inhibitoria del radical 1,1- Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)

La base de este método es la cuantificación de la capacidad que tiene un compuesto antioxidante para reducir el radical DPPH en 2,2-difenil-hidrazina (DPPH-H) o análogos de hidrazina sustituidos, al donar átomos de hidrógeno o electrones que reaccionan con el radical (Figura 7) (Alam et al., 2013).

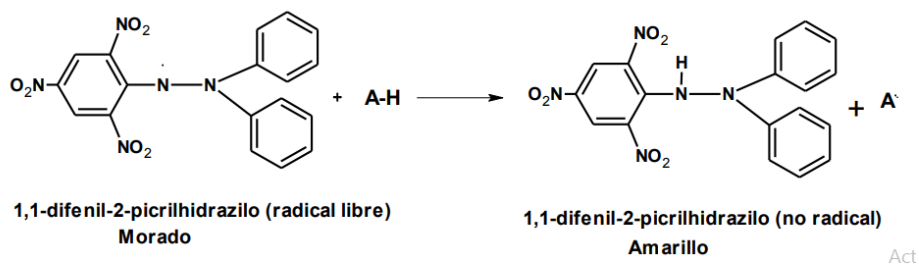


Figura 7. Reacción del radical DPPH en presencia del compuesto antioxidante durante el ensayo DPPH (Fuente: Alam et al., 2013).

ABTS

El fundamento de esta técnica es la cuantificación de la decoloración del radical $ABTS^{\bullet+}$ que se produce por una interacción que se establece con especies

donantes de hidrógeno o de electrones, dicho radical catiónico es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda a 734 nm (Figura 8).

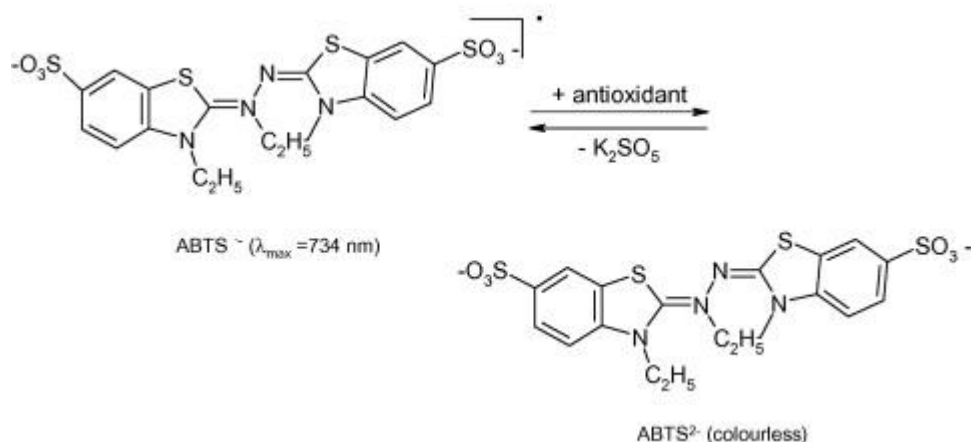


Figura 8. Reacción del radical ABTS en presencia del compuesto antioxidante durante el ensayo ABTS. (Zulueta y Frígola, 2009).

Péptidos antioxidantes

Se ha encontrado que después de una reacción de hidrólisis sobre las proteínas, los péptidos resultantes ejercen cierta actividad antioxidante, este mecanismo lo adquieren debido a que en la ruptura de los enlaces peptídicos quedan expuestos grupos R de aminoácidos más activos, reduciendo así la oxidación (Sarmadi & Ismail, 2010). El peso molecular de la mayoría de los péptidos antioxidantes que se han encontrado en alimentos va desde 500 y 1800Da, regularmente con residuos de aminoácidos como Val y Leu en el extremo N-Terminal y Pro, Hys, Tyr, Trp, Met y Cys en sus secuencias.

Por lo que, la importancia de los residuos de aminoácidos específicos en la secuencia de dichos péptidos se les ha atribuido principalmente a la capacidad de quelación de iones metálicos y metales de transición, la captación de radicales prooxidantes, la reducción de hidroxiperóxidos y la eliminación enzimática de oxidantes específicos (Sánchez et al., 2016).

2.6 Literatura citada

- Aguilar-Raymundo, V. G., & Vélez-Ruiz, J. F. (2013). Propiedades nutricionales y funcionales del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(2), 25-34.
- Al-Ali, H. A., Shah, U., Hackett, M. J., Gulzar, M., Karakyriakos, E., & Johnson, S. K. (2021). Technological strategies to improve gelation properties of legume proteins with the focus on lupin. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 68, 102634. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102634>
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Allende, D. B. (2016). Proteínas emergentes y su aplicación en la industria alimentaria. *Revista de la facultad de ciencias farmacéuticas y alimentarias*, 23 (Supl 1).
- Aluko, R. E. (2015). Antihypertensive peptides from food proteins. *Annual review of food science and technology*, 6, 235-262. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015520>
- Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A. L., & O'Mahony, J. A. (2017). The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 64, 1-12. <https://doi:10.1016/j.tifs.2017.01.008>
- Avanza, M. V., Chaves, M. G., Acevedo, B. A., & Añón, M. C. (2012). Functional properties and microstructure of cowpea cultivated in north-east Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, 49(1), 123-130. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.015>
- Badui D., S. (2006). *Química de los alimentos*. 4ª Ed., editorial Pearson Educación, México. 103-105.
- Benezer-Benezer, M., Castro-Mercado, E., & García-Pineda, E. (2008). La producción de especies reactivas de oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(1), 56-61.
- Benítez, R., Ibarz, A., y Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 42(2), 227-236.
- Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., & Kumar, V. (2019). A Review on Bioactive Peptides: Physiological Functions, Bioavailability and Safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 26, 139-150 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09823-5>
- Batista, A. P., Portugal, C. A. M., Sousa, I., Crespo, J. G., & Raymundo, A. (2005). Accessing gelling ability of vegetable proteins using rheological and fluorescence techniques. *International Journal of Biological*

- Bernardino Nicanor, A., Pérez Pérez, C., Vivar Vera, M. A., Montañez Soto, J. L. y González Cruz, L. (2014). Péptidos bioactivos de fuentes vegetales y animales. *Los alimentos en México y su relación con la salud*. 455-467
- 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 & Technology*, 49(1), 2–8. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12267>
- Bolaños Silvestre, E. (2011). Evaluación de las características físico químicas en frijol (*Phaseolus vulgaris*) variedad; Pinto Saltillo de dos periodos 2009 y 2010, Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Boschin, G., Scigliuolo, G. M., Resta, D., & Arnoldi, A. (2014). ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chemistry*, 145, 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.076>
- Broughton, WJ, Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. y Vanderleyden, J. (2003). Frijoles (*Phaseolus* spp.) - modelo de legumbres alimentarias. *Plant and Soil*, 252 (1), 55-128. <https://doi.org/10.1023/a:1024146710611>
- Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Flores-Coria, A., Gómez-Álvarez, E., & Barquera, S. (2021). Prevalencia, diagnóstico y control de hipertensión arterial en adultos mexicanos en condición de vulnerabilidad. Resultados de la Ensanut 100k. *Salud pública de México*, 61, 888-897. <https://doi.org/10.21149/10574>
- Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. Febrero 2020. Mercado del frijol, situación y prospectiva. <http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/53Mercado%20del%20frijol.pdf>
- Chai, K. F., Voo, A. Y. H., & Chen, W. N. (2020). Bioactive peptides from food fermentation: A comprehensive review of their sources, bioactivities, applications, and future development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3825-3885. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12651>
- Ciau-Solís, N. A., Acevedo-Fernández, J. J., y Betancur-Ancona, D. (2017). In vitro renin-angiotensin system inhibition and in vivo antihypertensive activity of peptide fractions from lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(2), 781–786. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8543>
- Cushman, D. W., y Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung.

- Biochemical pharmacology*, 20(7), 1637-1648.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(71\)90292-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(71)90292-9)
- Damodaran, S. (2005). Protein Stabilization of Emulsions and Foams. *Journal of Food Science*, 70(3), R54–R66. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07150.x>
- De la Serna, Fernando (2014). Novedades en el sistema renina-angiotensina. *Insuficiencia Cardíaca*, 9(1), 31-35.
- Du, M., Xie, J., Gong, B., Xu, X., Tang, W., Li, X., Li, C. & Xie, M. (2018). Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of Mung bean protein. *Food Hydrocolloids*, 76, 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.003>
- Elejalde Guerra, J. I. (2001). Oxidación, entre la vida y la enfermedad. *Anales de Medicina Interna*, 18(1), 9-14.
- Estrada Fabián, L. L., Álvarez Velásquez, I., Acosta Chi, Z. A., Bravo-Delgado, C.H., & Altamirano-Fortoul, R. (2019). Desarrollo de un producto de panificación con harina no convencional como complemento para la alimentación infantil. *Academia Journals*, ISBN 978-1-939982-45-2, (4), 614-619.
- Fennema R. Owen. (2000). Química de los alimentos. Segunda edición. España, Editorial Acribia
- Fideicomisos Instituidos en Relación con la agricultura (FIRA). (2016). Panorama Agroalimentario. Frijol 2016. Recuperado de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200638/Panorama Agroalimentario Frijol 2016.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200638/Panorama_Agroalimentario_Frijol_2016.pdf)
- Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA, 2019). Panorama Agroalimentario Frijol 2019. México: Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial. Recuperado de <https://www.fira.gob.mx/InvYEvalEcon/EvaluacionIF>
- Flachowsky, G., Meyer, U., & Südekum, K. H. (2017). Land Use for Edible Protein of Animal Origin. A Review. *Animals*, 7(12), 25. <http://doi:10.3390/ani7030025>
- Flores Anaya, S. M., Guevara Pérez, A., Córdova-Ramos, J. S., & Solari-Godiño A. (2020). Efecto del tiempo de hidrólisis enzimática sobre las propiedades tecno-funcionales y capacidad antioxidante de la pota *Dosidicus gigas*. *Ciencia e investigación*. 23(2):15-21. <http://dx.doi.org/10.15381/ci.v23i2.19377>
- Foegeding, E. A., Luck, P. J., & Davis, J. P. (2006). Factors determining the physical properties of protein foams. *Food Hydrocolloids*, 20(2-3), 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.03.014>
- Galicia Martínez, S., Torruco Uco, J., Negrete León, E., Cadena Pino, M.L., Acevedo Fernández, J.J., Angeles Chimal, J.S., Santa-Olalla Tapia, J., &

- Petricevich López, V.L. (2013). Actividad de los hidrolizados proteínicos de *Mucuna pruriens* en modelos in vivo que revierten enfermedades incluidas dentro del síndrome metabólico. En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero & D. Betancur Ancona (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 155-173). Barcelona: OmniaScience.
- Gálvez, A. & Salinas. G. "El papel del frijol en la salud nutrimental de la población mexicana" *Revista Digital Universitaria* [en línea]. 1 de febrero de 2015, Vol. 16, No.2 [Consultada:]. Disponible en Internet: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num2/art12/index.html> ISSN: 1607-6079.
- Gallegos Tintoré, S., Chel Guerrero, L., Corzo Ríos, L.J., Matínez Ayala, A.L. (2013). Péptidos con actividad antioxidante de proteínas vegetales. En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero & D. Betancur Ancona (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 111-122). Barcelona: OmniaScience.
- García, M. C., Puchalska, P., Esteve, C., & Marina, M. L. (2013). Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, 106, 328–349. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.041>
- Granito, M.; Guerra, M.; Torres, A., y Guinand, J. (2004). Efecto del procesamiento sobre las propiedades funcionales de *Vigna sinensis* Interciencia. *Asociación Interciencia Caracas*. 29(9):521-526.
- Guillén, M. V. L. (2009). Estructura y propiedades de las proteínas. *Bioquímica Médica*, 5, 1-34.
- Gundogan, R., & Can Karaca, A. (2020). Physicochemical and functional properties of proteins isolated from local beans of Turkey, *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109609>
- He, S., Zhao, J., Cao, X., Ye, Y., Wu, Z., Yue, J., ... & Sun, H. (2020). Low pH-shifting treatment would improve functional properties of black turtle bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate with immunoreactivity reduction. *Food chemistry*, 330, 127217. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127217>
- Hernández-López, V. M., Vargas-Vázquez, Ma. L. P., Muruaga-Martínez, J. S., Hernández-Delgado, S., & Mayek-Pérez, N. (2013). Origen, domesticación y diversificación del frijol común: Avances y perspectivas. *Revista fitotecnica mexicana*, 36(2), 95-104. Recuperado en 08 de agosto de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018773802013000200002&lng=es&tlng=es
- Hojilla-Evangelista, M. P., Sutivisedsak, N., Evangelista, R. L., Cheng, H. N., & Biswas, A. (2018). Composition and functional properties of saline-soluble protein concentrates prepared from four common dry beans (*Phaseolus*

- vulgaris* L.). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 95(8), 1001-1012. <https://doi.org/10.1002/aocs.12135>
- Jacinto-Hernández, C., Coria-Peña, M., Contreras-Santos, G., Martínez-López, L., Zapata-Martelo, E., & Ayala-Carrillo, Ma. del R. (2019). Azúcares totales y proteína en frijol nativo de la región Triqui Alta, Oaxaca. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(7), 1667-1674. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.2114>
- Jara-Romero, G. J., López-Valdez, F., Maldonado-Torres, D. A., Huerta-González, L., Luna Suárez, S. (2019). Proteínas en Alimentos ¿Buenas y ...Malas?. *Frontera Biotecnológica*. ISSN: 2448-8461. 9-13. <https://www.revistafronterabiotecnologica.cibatlaxcala.ipn.mx/volumen/vol14/pdf/vol-14-2.pdf>
- Jarpa-Parra, M. (2017). Lentil protein: a review of functional properties and food application. An overview of lentil protein functionality. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(4), 892–903. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13685>
- Kamal, H., Mudgil, P., Bhaskar, B., Fisayo, A. F., Gan, C.-Y., & Maqsood, S. (2021). Amaranth proteins as potential source of bioactive peptides with enhanced inhibition of enzymatic markers linked with hypertension and diabetes. *Journal of Cereal Science*, 101, 103308 <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103308>
- Kristinsson HG y Rasco BA. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* 40, 43-81
- Lafarga, T., Álvarez, C., Villaró, S., Bobo, G., & Aguiló-Aguayo, I. (2019). Potential of pulse-derived proteins for developing novel vegan edible foams and emulsions. *International Journal of Food Science & Technology*. <https://doi:10.1111/ijfs.14286>
- Lara Flores, M., "El cultivo del frijol en México". Revista Digital Universitaria [en línea]. 1 de febrero de 2015, Vol. 16, No.2 [Consultada:]. Disponible en Internet: <<http://www.revista.unam.mx/vol.16/num2/art09/index.html>> ISSN: 1607-6079.
- Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288-306.
- Liceaga, A. M., & Hall, F. (2019). Nutritional, Functional and Bioactive Protein Hydrolysates. Reference Module in Food Science. 456-464 <https://doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.21776-9>
- López, S. J. L.; Ruiz, C. J. A.; Sánchez, G. J. J., & Lépiz, I. R. (2005). Adaptación climática de 25 especies de frijol silvestre (*Phaseolus* spp.) en la república mexicana. *Rev. Fitotec. Méx.* 28(3). 221-230. <https://doi.org/10.35196/rfm.2005.3.221>

- Lupano, C. E. (2013). Modificaciones de componentes de los alimentos: cambios químicos y bioquímicos por procesamiento y almacenamiento. Editorial de la Universidad de la Plata.
- Malca, S., Lucas, O., Arbaiza, T., Carcelén, F., & San Martín, F. (2006). Comparación de dos técnicas para determinar la digestibilidad proteica de insumos y alimentos comerciales para caninos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 17(2), 96-103.
- Martínez Augustin, O., & Martínez de Victoria, E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición hospitalaria*, 21, 01-14.
- Martínez-Medina, G.A.; Prado-Barragán, A.; Martínez Hernández, J.L.; Ruíz, H.A.; Rodríguez, M.R.; Contreras-Esquivel, J.C., & Aguilar, C.N. (2019). Peptidos bio-funcionales: Bioactividad, producción y aplicaciones. *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 13, 1–7.
- Mena Roa, M. (6 septiembre de 2022). Más de 15.000 litros de agua por cada kg de carne de res. STATISTA. <https://es.statista.com/grafico/8316/gasto-de-agua-de-alimentos/>
- Morales Olivas, F. J., & Estañ Yago, L. (2010). Conceptos nuevos sobre el sistema renina angiotensina. Hipertensión y Riesgo Vascular, 27(5), 211–217. <https://doi:10.1016/j.hipert.2009.09.002>
- 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. <https://doi:10.1016/j.arteri.2011.04.004>
- Mustăţea, G., Ungureanu, E.L. & Lorga, E. (2019). Protein acidic hydrolysis for amino acids analysis in food—Progress over time: A short review. *J. Hyg. Eng. Des.* 26, 81–87, ISSN 1857-8489
- Nasri, M. (2017). Protein Hydrolysates and Biopeptides. *Advances in Food and Nutrition Research*, 109–159. <https://doi:10.1016/bs.afnr.2016.10.003>
- Ochoa Pachas, K. G. (2017). Hidrólisis enzimática en una y dos etapas de la proteína de la cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) para obtener péptidos bioactivos. Tesis de Maestría. Lima Perú.
- Olmedilla Alonso, B., Farré Rovir, R., Asensio Vegas, C. & Martín Pedrosa, M. (2010). Papel de las leguminosas en la alimentación actual. *Actividad Dietética*, 14 (2), 72–76. [https://doi.org/10.1016/S1138-0322\(10\)70014-6](https://doi.org/10.1016/S1138-0322(10)70014-6)
- Ondetti, M., Rubin, B., & Cushman, D. (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science*, 196(4288), 441–444. <https://doi:10.1126/science.191908>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2016). Legumbres. Semillas nutritivas para un futuro sostenible. <https://www.fao.org/3/i5528s/i5528s.pdf>

- Pacheco, Y. G., Mercado, D. C., Santos, J. A. B., & Arrieta, M. J. C. (2019). Efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre las propiedades tecfuncionales de la harina de frijol blanco (*Phaseolus lunatus* L.) y la determinación de su potencial uso agroalimentario. *INGE CUC*, 15(2).
- Pérez-Navarrete, C., Cruz-Estrada, R. H., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D. (2006). Caracterización física de extrudidos preparados con mezclas de harinas de maíz QPM (*Zea mays* L.) y frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 5(2), 145-155. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62050205>
- Portillo, L. L., Campos, M. G., Barrios, E. M., Bustamante, R. C., Rivera, N. M., & Mayans, J. R. (2006). La dieta vegetariana en los niños. Ventajas, desventajas y recomendaciones dietéticas. *Acta Pediátrica de México*, 27(4), 205-212.
- Quesada, D., & Gómez, G. (2019). ¿Proteínas de origen vegetal o de origen animal?: Una mirada a su impacto sobre la salud y el medio ambiente. *Revista de nutrición clínica y metabolismo*, 2(1), 79-86. <https://doi.org/10.35454/rncm.v2n1.063>
- Reyes Rivas, E., Padilla Bernal, L.E., Pérez Veyna, O., y López Jáquez, P. (2008). Historia, naturaleza y cualidades alimentarias del frijol, *Revista Investigación Científica*. 4(3). 1-21. <http://ricaxcan.uaz.edu.mx/jspui/handle/20.500.11845/268>
- Rhile, I. J., Markle, T. F., Nagao, H., DiPasquale, A. G., Lam, O. P., Lockwood, M. A., & Mayer, J. M. (2006). Concerted proton– electron transfer in the oxidation of hydrogen-bonded phenols. *Journal of the American Chemical Society*, 128(18), 6075-6088.
- Rico-Rosillo, M. G., Oliva-Rico, D., & Vega-Robledo, G. B. (2018). Envejecimiento: algunas teorías y consideraciones genéticas, epigenéticas y ambientales. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 56(3), 287-294. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=457757174017>
- Rogovina, L. Z., Vasil'ev, V. G., & Braudo, E. E. (2008). Definition of the concept of polymer gel. *Polymer Science Series C*, 50(1), 85-92.
- Ruíz, S. R. 2009. Análisis de la diversidad genética de *Phaseolus coccineus* L. de la subprovincia Carso Huasteco de México. Tesis Maestro en Ciencias. Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México. 65 p.
- Ruiz-Salazar, R., S. Hernández Delgado, M. L. P. Vargas Vázquez & N. Mayek-Pérez. (2021). Estado actual de los recursos genéticos de *Phaseolus coccineus* (Fabaceae) en México. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 56: 289-305. <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v56.n3.32297>.

- (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [SAGARPA]). 2017. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256428/B_sico-Frijol.pdf
- Salinas, A. D. (1988). *Phaseolus* in archaeology. In P. Gepts. *Genetic resources of Phaseolus* beans. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 442-463.
- Sánchez-Mendoza, N.A., Cruz-Castellanos, M., Dávila-Ortiz, G., & Jiménez-Martínez, C. (2016). Péptidos con actividad antioxidante provenientes de fuentes animales y vegetales. En M.E. Ramírez Ortiz (Ed.). *Alimentos Funcionales de Hoy*. Barcelona, España: OmniaScience. 117-142.
- Sánchez-Valle V, & Méndez-Sánchez N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Med Sur*, 20(3):161-168.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>
- Schisano, C., Narciso, V., Maisto, M., Annunziata, G., Grieco, P., Sommella, E. M., Tenore, C. G., & Novelillo, E. (2019). In vitro effects of protein fractions from Controne beans (*Phaseolus vulgaris* L. ecotype Controne) on intestinal permeability, ACE and α -amylase activities. *Eur Food Res Technol* 245, 2311–2322. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03338-5>
- Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., y Betancur-Ancona, D. (2010). Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. *Rev Chil Nutr.* 37(3). 386-391. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182010000300014>
- Sim, S. Y. J., Srv, A., Chiang, J. H., & Henry, C. J. (2021). Plant proteins for future foods: A roadmap. *Foods*, 10(8), 1967 <https://doi.org/10.3390/foods10081967>
- Tan, E. S., Ying-Yuan, N., & Gan, C. Y. (2014). A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimisation. *Food chemistry*, 152, 447-455. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.008>
- Tang, X., Shen, Y., Zhang, Y., Schilling, M. W., & Li, Y. (2021). Parallel comparison of functional and physicochemical properties of common pulse proteins. *LWT*, 146, 111594. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111594>
- Teniente-Martínez, G., González, C. L., Cariño-Cortés, R., & Bernardino-Nicanor, A. (2016). Caracterización de las proteínas del frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1(1), 1-6.
- Teniente-Martínez, G., González-Cruz, L., Hernández-Galván, A.N., Juárez-Goiz, J.M.S., Bernardino-Nicanor, A. (2019). Propiedades funcionales del aislado proteínico de dos variedades de frijol ayocote (*Phaseolus*

coccineus). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, (4), 48-55.

- Torres Torres, F., & Rojas Martínez, A. (2018). Suelo agrícola en México: Retrospección y prospectiva para la seguridad alimentaria. *Revista internacional de estadística y geografía*, 9(3), 137-155 http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/sitios/rdebeta/rde_26a/RDE26_06.pdf
- Torruco-Uco, J. G., Domínguez-Magaña, M. A., Dávila-Ortíz, G., Martínez-Ayala, A., Chel-Guerrero, L. A., y Betancur-Ancona, D. A. (2008). Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(2), 158–168. <https://doi.org/10.1080/11358120809487641>
- Tovar-Benítez, T., Vega-Zuñiga, K. A., Porras-Saavedra J. & Pérez-Pérez N. C. (2020). Evaluación de la actividad antioxidante de hidrolizados proteicos obtenidos de semillas de frijol bayo cultivadas en el valle del mezquital. *Revista de ingeniería y tecnología para el desarrollo sustentable (REINGTEC)*, (8), 22-25
- Ulug, S. K., Jahandideh, F., & Wu, J. (2021). Novel technologies for the production of bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 108, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.002>
- Van Acker, S. A., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J., & Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 331-342.
- Vargas-Vázquez, Ma. L. P., Muruaga Martínez, J. S., Lépiz Ildefonso, R., & Pérez Guerrero, A. (2012). La colección del INIFAP de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) I. Distribución geográfica de sitios de colecta. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(6), 1247-1259 <https://doi.org/10.29312/remexca.v3i6.1375>
- Vargas, F., Rivas, C., Nursamaa, A., & Zoltan, T. (2007). Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances en Química*, 2(2), 3-15.
- Vargas-Vázquez, P., Muruaga-Martínez, J. S., Martínez-Villarreal, S. E., Ruiz-Salazar, R., Hernández-Delgado, S., & Mayek-Pérez, N. (2011). Diversidad morfológica del frijol ayocote del Carso Huasteco de México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82(3), 767-775. Recuperado en 09 de agosto de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532011000300005&lng=es&tlng=es.
- Wang, T., & Lü, X. (2021). Overcome saccharification barrier: advances in hydrolysis technology. In *Advances in 2nd Generation of Bioethanol Production*. 137-159. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818862-0.00005-4>

- Wagner Grau, P. (2018). Pathophysiology of hypertension: new concepts. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 64(2), 175-184.
- Wilkinson, J. M., & Lee, M. R. F. (2017). Review: Use of human-edible animal feeds by ruminant livestock. *Animal*, 12(08), 1735–1743. <https://doi.org/10.1017/S175173111700218X>
- Xia, W., Siu, W. K., & Sagis, L. M. C. (2021). Linear and non-linear rheology of heat-set soy protein gels: Effects of selective proteolysis of β -conglycinin and glycinin. *Food Hydrocolloids*, 120, 106962. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106962>
- Yang, F., Chen, X., Huang, M., Yang, Q., Cai, X., Chen, X., ... & Wang, S. (2021). Molecular characteristics and structure–activity relationships of food-derived bioactive peptides. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(9), 2313–2332. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63463-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63463-3)
- Zapata, J. E., Moya, M., & Figueroa, O. A. (2019). Hidrólisis Enzimática de la Proteína de Vísceras de Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*): Efecto del tipo de Enzima, Temperatura, pH y Velocidad de Agitación. *Información tecnológica*, 30(6), 63-72. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642019000600063>
- Zeb, A. (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), e13394.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>

3. OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEICOS DE FRIJOL AYOCOTE Y SU CARACTERIZACIÓN

RESUMEN

El rendimiento obtenido de harina de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*) crudo (HFACr) y cocido (HFACo) fue 71.62 % y 55.78 %, respectivamente. La mayor solubilidad de las proteínas en ambas harinas se encontró a pH 12 y la menor a pH 4.4 (HFACr) y pH 4 (HFACo), valores utilizados para la extracción de proteínas. El contenido proteico fue de 58.83 ± 0.87 % en proteínas aisladas de frijol ayocote crudo (PFACr) y 71.36 ± 2.84 % en cocido (PFACo). La digestibilidad fue mayor en PFACo (85 ± 0.22 %). La capacidad de retención de agua en HFACr y HFACo fue menor (1.38 ± 0.06 y 2.28 ± 0.15 g agua/ g de harina) que en PFACr y PFACo ($4.24 \pm$ y 2.51 g de agua/g de proteína). La capacidad y estabilidad espumante fue mayor a pH 6 en HFACr (53.3 ± 5.8 %), mientras que a pH 3 fue mayor en PFACo (79.17 ± 1.2 %). La capacidad emulsionante fue afectada por el tratamiento térmico sobre la harina, mientras que en proteínas fue el pH. Se formaron geles a partir de una concentración de proteína de $12 \text{ g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ dispersión. La hidrólisis enzimática secuencial con pepsina y pancreatina mostró un mayor grado de hidrólisis (48.4 ± 5.70 %) sobre PFACo. Las muestras con proteínas e hidrolizados presentaron compuestos fenólicos totales (15.55 ± 0.19 – 25.07 ± 3.97 mg EAG•Kg⁻¹) y actividad antioxidante sobre los radicales DPPH y ABTS, mostrando menores valores de IC₅₀ sobre el radical ABTS (0.006 ± 0.002 mg de proteína) PFACo hidrolizada. Adicionalmente, PFACr y PFACo no hidrolizadas exhibieron mayor actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I), 95.65 ± 6.12 y 94.56 ± 4.61 %, respectivamente. Las proteínas de frijol ayocote presentaron propiedades tecno-funcionales adicionalmente los hidrolizados presentaron actividad antioxidante y antihipertensiva.

Palabras clave: *Phaseolus coccineus*, proteínas, propiedades tecno-funcionales, hidrólisis enzimática, actividad antioxidante, actividad antihipertensiva.

3. OBTAINING AND CHARACTERIZING PROTEIN HYDROLYSATES FROM AYOCOTE BEANS

ABSTRACT

The yield obtained from raw (HFACr) and cooked (HFACo) ayocote bean (*Phaseolus coccineus*) flour was 71.62 % and 55.78 %, respectively. The highest protein solubility in both flours was found at pH 12 and the lowest at pH 4.4 (HFACr) and pH 4 (HFACo), values used for protein extraction. The protein content was 58.83 ± 0.87 % in proteins isolated from raw ayocote bean (PFACr) and 71.36 ± 2.84 % in cooked (PFACo). Digestibility was higher in PFACo (85 ± 0.22 %). Water holding capacity in HFACr and HFACo was lower (1.38 ± 0.06 and 2.28 ± 0.15 g water/g flour) than in PFACr and PFACo ($4.24 \pm$ and 2.51 g water/g protein). Foaming capacity and stability was higher at pH 6 in HFACr (53.3 ± 5.8 %), while at pH 3 it was higher in PFACo (79.17 ± 1.2 %). The emulsifying capacity was affected by the heat treatment on flour, while in proteins it was the pH. Gels were formed from a protein concentration of $12 \text{ g} - 100 \text{ mL}^{-1}$ dispersion. Sequential enzymatic hydrolysis with pepsin and pancreatin showed a higher degree of hydrolysis (48.4 ± 5.70 %) over PFACo. Samples with protein and hydrolysates presented total phenolic compounds ($15.55 \pm 0.19 - 25.07 \pm 3.97$ mg EAG-Kg⁻¹) and antioxidant activity over DPPH and ABTS radicals, showing lower IC₅₀ values over ABTS radical (0.006 ± 0.002 mg protein) hydrolyzed PFACo. Additionally, non-hydrolyzed PFACr and PFACo exhibited higher angiotensin I-converting enzyme (ACE-I) inhibitory activity, 95.65 ± 6.12 and 94.56 ± 4.61 %, respectively. The ayocote bean proteins exhibited techno-functional properties and hydrolysates exhibited antioxidant and antihypertensive activity.

Key words: *Phaseolus coccineus*, proteins, techno-functional properties, enzymatic hydrolysis, antioxidant activity, antihypertensive activity.

Thesis Chapingo Autonomous University
Author: Lilia Lucía Estrada Fabian
Advisor: Dra. Ofelia Sandoval Castilla
Coadvisor: Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez

3.1 INTRODUCCIÓN

Las proteínas son compuestos orgánicos de alto peso molecular que poseen cadenas de aminoácidos, de las cuales se obtienen moléculas nitrogenadas que permiten conservar la estructura y el crecimiento de quien las consume (Téllez, 2022), además, se ha demostrado que estas tienen impacto positivo en la salud humana cuando son sometidas a una reacción de hidrólisis por enzimas, generando cadenas de aminoácidos más cortas llamadas péptidos (Cu-Cañeta, 2015).

Por otra parte, se ha informado que el uso de las proteínas en la industria alimentaria ha sido amplio debido a sus propiedades tecno-funcionales, definido como el comportamiento que tienen como biopolímero coloidal con o sin otros ingredientes en un sistema alimentario, en función de sus propiedades moleculares en su estado nativo, intermedio o desnaturalizado (Akharume et al., 2021), además, el tratamiento térmico y pH afectan positiva o negativamente a dichas propiedades, a través del despliegue de las proteínas, modificando el contenido de aminoácidos ácidos, básicos, hidrofóbicos o sin carga (Aguilera, 2009).

Actualmente, debido al nuevo estilo de vida de los consumidores, más personas eligen consumir proteínas de origen vegetal reemplazando a las de origen animal, esta tendencia está influenciada por el mayor conocimiento y conciencia sobre los ingredientes de los alimentos, así como el creciente interés en las fuentes de alimentos que no afecten al medio ambiente (Kusumah et al., 2020).

Aunado a lo anterior, las leguminosas se encuentran entre las fuentes de proteínas vegetales más económicas y convenientes para el consumo humano, especialmente en regiones donde las proteínas de origen animal son limitadas o inaccesibles (Hojilla-Evangelista et al., 2018), dentro de este grupo de leguminosas, el frijol es el más destacado y consumido en México debido a su valor nutricional, principalmente por su alto contenido de proteína (14-33%) y el valor biológico de las mismas.

En la actualidad, existe información de propiedades biológicas y tecnofuncionales de las proteínas de *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus lunatus*, entre otras (Ramírez-Jiménez et al., 2014; Polanco-Lugo, et al., 2014; Tan et al., 2014; Wani et al., 2015). Sin embargo, no existe suficiente información acerca del frijol ayocote, en consecuencia, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antioxidante y antihipertensiva de péptidos bioactivos obtenidos por la hidrólisis secuencial con pepsina y pancreatina de aislados de proteínas de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*) crudo y cocido, así como las propiedades tecnofuncionales de las proteínas nativas.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Materiales

El frijol ayocote se obtuvo de Ciudad Serdán (18° 59' Norte, 97° 27' Oeste y 2520 msnm), Puebla, México. El ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH), etanol, metanol, éter de petróleo, carbonato de sodio (Na_2CO_3), sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), dodecil sulfato de sodio ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$), tartrato de sodio y potasio ($\text{KOCO}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Folin Ciocalteu-fenol, albúmina sérica bovina (BSA), pepsina (3.4.23.1), pancreatina (3.4.21.70), ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS), sulfito de sodio (Na_2SO_3), L-leucina ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$), ácido gálico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), hipuril-histidil-leucina (HHL), acetato de etilo ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) y enzima convertidora de angiotensina (ECA-I, 3.4.15.1) se obtuvieron de Sigma-Aldrich México (Toluca, Estado de México, México). El aceite de soya (Nutrioli, Ragasa Industrias, S.A. de C.V., Monterrey, Estado de Nuevo León, México) se obtuvo del supermercado local del Estado de México.

3.2.2 Obtención de la harina

Para obtener la harina (HFACo), se seleccionó el frijol con las siguientes medidas: largo (1 - 1.8 cm), ancho (0.7 - 1.3 cm) y grosor (0.4 - 0.6 cm) (Vargas-Vázquez et al., 2011), el cual fue sometido a remojo aproximadamente en una relación 1:3 en agua a temperatura ambiente durante 2 h para facilitar la separación de la testa del cotiledón. Una vez separada la testa del cotiledón manualmente, este último fue sometido a cocción durante 60 min a $96 \pm 1^\circ\text{C}$, se escurrió el agua de cocción y fue sometido a secado en un deshidratador eléctrico (Marca Excalibur digital, Modelo EXC10 EL,) por 24 h a 60°C . La reducción de tamaño de partícula se realizó mediante molienda en Pulverizador, (Quebradoras, Molinos y Mezcladoras Lasser/Kenito) y finalmente se tamizó en una malla No. 80 con el fin de conseguir un tamaño de partícula homogéneo. Para obtener la harina del

frijol ayocote crudo (HFACr), se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente sin aplicar el proceso de cocción al cotiledón (Estrada et al., 2019).

3.2.3 Análisis químico proximal

El contenido de humedad se realizó mediante el método gravimétrico; proteína por método Kjeldahl (factor 6.25); obtención del extracto etéreo con reflujo por Soxhlet, cenizas por incineración y fibra de HFACr y HFACo se determinó utilizando los métodos estandarizados de acuerdo con la AOAC (1997) y el contenido de carbohidratos totales se determinó por diferencia.

3.2.4 Desgrasado de las muestras de harina

Las diferentes harinas fueron desgrasadas mediante reflujo con éter de petróleo (60 °C) en un equipo Soxhlet durante 6 h (Raya-Pérez et al., 2014). Las muestras desgrasadas se conservaron a -20 ± 1 °C hasta su análisis posterior.

3.2.5 Perfil de aminoácidos

El perfil de aminoácidos de las harinas HFACr y HFACo se realizó en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ). Se determinó por el método interno del CIATEJ de “INS-SM/US-260” de aminoácidos totales.

3.2.6 Obtención de aislados proteicos

Para la obtención de los aislados proteicos de ambas muestras, se empleó el método reportado por Betancur et al. (2004) con algunas modificaciones. En primer lugar, se evaluó la solubilidad de las proteínas de ambas muestras en un rango de pH de 2 a 13.

Con este objetivo, dispersiones de HFACr y HFACo en agua destilada ($0.05 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) fueron ajustados a los diferentes valores de pH con NaOH 1 M y/o HCl 1 M utilizando un potenciómetro (Conductronic PC45, Conductronic, Puebla, Puebla, México) y se agitaron durante 60 min a 400 rpm. Posteriormente, se

centrifugaron (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania) a 8000 rpm, 4 °C por 15 min, el sobrenadante fue utilizado para cuantificar la proteína soluble.

El contenido de proteína soluble se determinó mediante el método de Lowry modificado por Peterson (1977). Para ello, 20 µl de muestra fueron diluidos en 980 µl de agua destilada los cuales fueron mezclados con 1 ml de una solución compuesta por Na₂CO₃ (Carbonato de sodio) al 10 %, KOCO(CHOH)₂COONa•4H₂O (Tartato de sodio y potasio) al 0.2 %, CuSO₄•5H₂O (sulfato de cobre) al 0.1 %, dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 % (p/v) y NaOH (hidróxido de sodio) 0.8 N. Posteriormente, se agitó y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente.

A la mezcla anterior se le añadió 0.5 ml de Folin Ciocalteu-fenol 0.3 N dejándolo reaccionar durante 30 minutos, en oscuridad y a temperatura ambiente (23 °C). Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 750 nm con el espectrofotómetro Genesys 10S UV–VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA.).

Se construyó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma A-8531) en un intervalo de concentración de 0.01 – 0.1 mg ml⁻¹ y se obtuvo la ecuación de ajuste $y = 4.3289x + 0.1292$; $R^2 = 0.9905$, en donde y es la absorbancia y x la concentración de BSA). Los resultados se expresaron como concentración de proteína soluble disuelta respecto a la cantidad inicial. Se calculó la concentración de proteína soluble en cada uno de los valores de pH evaluados, utilizando la Ecuación (1) (Zhang et al., 2020).

$$Proteína\ soluble\ (mgml^{-1}) = \frac{Concentración\ de\ proteína\ soluble\ (mgml^{-1})}{4.3289}$$

Una vez identificado el pH de mayor solubilidad (pH 12) y el punto isoeléctrico (pI) (pH 4), se dispersaron las muestras de harina en agua destilada en una relación 1:10 (p/v) ajustándola a pH 12 con NaOH (6 M) y se dejó en agitación constante (60 min, 400 rpm, 23 °C). Posteriormente, la muestra se llevó a

centrifugar (8000 rpm, 4 °C, 15 min) (Centrifuga 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania). El sobrenadante se ajustó a pH 4 con HCl (6 M) y se mantuvo en agitación (60 min, 400 rpm, 23 °C), transcurrido el tiempo se llevó a centrifugar bajo las mismas condiciones mencionadas. Posteriormente, el sobrenadante se descartó y el residuo se sometió a secado en charolas dentro de una estufa (Riossa Digital HCF-62, Ciudad de México, México) a 37 ± 1 °C, por 12 h. Las muestras obtenidas, proteínas de frijol ayocote crudo (PFACr) y cocido (PFACo) se congelaron (-20 ± 1 °C) hasta su uso posterior.

3.2.7 Potencial Zeta (ζ)

Se midió el potencial Zeta (ζ) a dispersiones acuosas de PFACr y PFACo (0.05 % p/v), cuyo pH se ajustó a valores en el rango de 3 a 7 con NaOH 1 M o HCl 1 M y utilizando un potenciómetro (Conductronic PC45, Puebla, México). Se utilizó un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido), que convierte las medidas de la movilidad electroforética en valores de potencial z utilizando el modelo matemático de Smoluchowski (López-Monterrubio et al., 2020).

3.2.8 Digestibilidad relativa

La digestibilidad relativa *in vitro* se determinó en las muestras PFACr y PFACo. Para ello se utilizó el método multienzimático descrito por Martínez-Velasco et al. (2018) con algunas modificaciones. Se utilizaron para la digestión enzimática: Tripsina pancreática porcina (Tipo IX, 15310 U mg⁻¹ de proteína), quimotripsina pancreática bovina (tipo II, 48 U g⁻¹ de sólido) y proteasa bacteriana (Tipo XIV, 4.4 U mg⁻¹ de sólido) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA). A cada muestra (63.8 mg) se añadieron 10 ml de agua destilada y se ajustó a pH 8 con NaOH (1 M) utilizando un potenciómetro (Conductronic PC45, Puebla, México).

Posteriormente, se añadió 1 ml de disolución acuosa enzimática (1.76 mg de tripsina y 4.38 mg de quimotripsina) y se permitió la digestión (10 min, 100 rpm, a 37 °C). Después de la adición de 1 ml (1.86 mg) de disolución de proteasa

bacteriana, la digestión prosiguió (9 minutos, 100 rpm, 55 °C). Posteriormente, la reacción se detuvo colocando la suspensión en un baño de agua a 85 °C por 5 min. La temperatura se redujo a 35 °C, se midió el pH y este valor fue utilizado para estimar la digestibilidad relativa *in vitro* de las proteínas de acuerdo con la Ecuación (2).

$$DPR (\%) = 234.84 - 22.56 X \text{ (Ec. 2)}$$

Donde DPR es la digestibilidad proteínica relativa y X es el pH de las dispersiones.

3.2.9 Propiedades tecno-funcionales

a) Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (CRA) se evaluó siguiendo la metodología descrita por García-Vaquero et al. (2017) con algunas modificaciones. La muestra (1 g) se mezcló con 10 ml de agua destilada y se dejó en agitación constante (16 h, 100 rpm, 23 °C), posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 30 min. Los sobrenadantes obtenidos se decantaron y se pesaron los sedimentos. La CRA se expresó como gramos de agua retenidos por 100 g de muestra utilizando la Ecuación (3).

$$CRA = \frac{w_2 - w_1}{w_0} \times 100 \text{ (Ec. 3)}$$

donde; w_0 es el peso de la muestra seca (g), w_1 el peso del tubo más la muestra seca (g) y w_2 el peso del tubo más el sedimento (g).

b) Capacidad de retención de aceite

La capacidad de retención de aceite (CRG) se evaluó siguiendo la metodología descrita por García-Vaquero et al. (2017) con algunas modificaciones. La muestra (1 g) se mezcló con 10 ml de aceite de soya y se dejó en agitación constante (16 horas, 100 rpm, 23 °C), posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 30 min. Los sobrenadantes obtenidos se decantaron y se pesaron los

sedimentos. La CRG se expresó como gramos aceite de soya retenidos por 100 g de muestra utilizando la Ecuación (4).

$$CRG = \frac{w_2 - w_1}{w_0} \times 100 \text{ (Ec. 4)}$$

donde; w_0 es el peso de la muestra seca (g), w_1 el peso del tubo más la muestra seca (g) y w_2 el peso del tubo más el sedimento (g).

c) Capacidad espumante (CEs) y estabilidad de espuma (EEs)

La capacidad espumante (CE) se evaluó siguiendo la metodología de Lafarga et al. (2018) con algunas modificaciones. En 15 ml de agua destilada ajustada a diferentes valores de pH (3 y 6) se suspendió la muestra (harina y concentrado de proteína) en una concentración de 1.5 % p/v, la dispersión se dejó en agitación constante (15 h, 300 rpm, 23 °C.) Las suspensiones se homogenizaron utilizando un medidor digital homogeneizador Ultra-Turrax (T 25 digital ULTRA-TURRAX®-IKA) a 10,000 rpm durante 1 min y el volumen de espuma generado se midió después de 30 s. La capacidad de formación de espuma se evaluó con la Ecuación (5).

$$CE = \frac{v_f - v_0}{v_0} \times 100 \text{ (Ec. 5)}$$

donde; v_0 es el volumen inicial de la solución de la muestra antes de la homogeneización y v_f es el volumen de espuma generado después de la homogeneización. La estabilidad de la espuma se expresó el volumen de espuma residual a los 5, 10, 15, 30, 60 y 120 min después de la homogeneización de la mezcla.

d) Capacidad emulsionante (CEm)

Para evaluar la capacidad emulsionante (CEm) se siguió la metodología descrita por Alfaro-Díaz et al. (2020) con algunas modificaciones. Se prepararon dispersiones de harina y concentrado de proteína al 2.5 % (p/v) y se ajustaron a

pH 3,0 y pH 6,0 utilizando HCl 0.1 M, las cuales se dejaron en agitación constante (16 h, 300 rpm, 23 °C), lo anterior para asegurar la dispersión completa de las muestras. En tubos de centrifuga de 50 ml, se agregaron 10 ml de solución de la harina y 10 ml de aceite de soya y se homogeneizaron en un Ultra-Turrax (T 25 digital ULTRA-TURRAX®-IKA) a 21600 rpm durante 1 min. Las emulsiones se centrifugaron a 3075 rpm durante 5 min. La capacidad emulsionante se evaluó con la Ecuación (6).

$$CEm = \frac{V_1}{V_0} \times 100 \text{ (Ec. 6)}$$

Donde V_1 es el volumen de la fase emulsionada (ml) y V_0 es el volumen total de la solución (ml).

e) Capacidad de gelificación

Para evaluar la capacidad gelificante se siguió el método descrito por Coffmann et al. (1977) con algunas modificaciones. Se prepararon dispersiones de concentrado de proteína al 10, 12, 14 y 16 % (p/v) en agua destilada, ambas muestras se ajustaron a pH 7 y dejaron en agitación constante (16 h, 300 rpm, 23 °C), lo anterior para asegurar la dispersión completa de las muestras. Posteriormente, las muestras se colocaron en baño maría (96 °C, 15 minutos), transcurrido este tiempo se colocaron en refrigeración (4 ° C, 2 h). El resultado se expresó como la concentración mínima de gelificación (CMG) cuando la muestra al ser invertida no se deslizó.

3.2.10 Hidrólisis enzimática

El proceso de digestión gastrointestinal simulada (DGIS) se llevó a cabo de acuerdo con la metodología propuesta por Ketnawa et al. (2016). Con base en la concentración de proteína de cada concentrado proteico (15 mg ml⁻¹) se pesó la cantidad necesaria para preparar 24.5 ml de una dispersión al 5 % (p/v) con agua destilada. De la dispersión preparada se tomó una alícuota de 5 ml. El volumen restante (19.5 ml) se ajustó a pH 2 con HCl 6 M y se agregó pepsina (4 g enzima•

100 g⁻¹ de proteína) para iniciar la primera etapa de DGIS. La mezcla anterior se incubó por 2 h a 37 °C con agitación continua.

Transcurrido el tiempo se ajustó el pH a 7.5 con NaOH 6 M y se agregó pancreatina (10 g enzima•100 g⁻¹ de proteína) para iniciar la segunda etapa de DGIS, la mezcla se mantuvo a 37 °C por 2 h con agitación continua. Las alícuotas tomadas al tiempo cero (sin hidrolizar) y al final de la etapa de DGIS (hidrolizada) se colocaron en agua a ebullición (96 °C) por 15 min y centrifugaron a 6000 rpm durante 30 min a 4°C. Los sobrenadantes se almacenaron a -4 °C para su análisis posterior.

Determinación del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) se determinó de acuerdo con el método reportado por Adler-Nissen (1979) con algunas modificaciones. En tubos de ensayo ámbar se adicionaron 64 µl de muestra, 1 ml de amortiguador de fosfatos (0.1 M, pH 8.2) y 0.5 ml de ácido 2,4,6-Trinitrobencenosulfónico (TNBS) al 0.2 % UNIDADES. La mezcla de reacción se agitó (15 s) en vórtex modelo Genie 2 (Scientific Industries®, EUA) y se incubó en baño maría a 50 °C por 30 min en la oscuridad. La reacción se detuvo con la adición de 1 ml de sulfito de sodio 0.1 M. La mezcla reposó (15 min, 23 °C) y se midió la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV–VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA.).

Para la hidrólisis ácida total se agregó 0.1 g de muestra (PFACr y PFACo) y se le adicionó 0.9 ml de HCl 6 N, la mezcla se incubó en una estufa (Riossa Digital HCF-62, Ciudad de México, México) durante 24 h a 100°C. Transcurrido este tiempo la muestra se neutralizó añadiendo 0.9 ml de NaOH 6 N, posteriormente se agitó y se filtró con de PTFE (0.45 µm). Los valores obtenidos se interpolaron en una curva estándar de L-leucina (0-6 mM) y el resultado se expresó en términos de los grupos α-amino terminal. El GH se definió con la Ecuación (7).

$$\%GH = \frac{(NH_2)t_x - (NH_2)t_o}{(NH_2)_{HT} - (NH_2)t_o} \times 100 \text{ (Ec. 7)}$$

Donde:

$(NH_2)t_x$ = cantidad de grupos α -amino terminal al tiempo t_x

$(NH_2)t_o$ = cantidad de grupos α -amino terminal al tiempo 0

$(NH_2)_{HT}$ = cantidad de grupos α -amino terminal determinados en las muestras después de una hidrólisis ácida total.

3.2.11 Actividad antioxidante

a) Compuestos fenólicos totales (CFT)

Se determinó la concentración de compuestos fenólicos totales (CFT) de las muestras y sus hidrolizados. Para ello se siguió el método descrito por Gómez-Maldonado et al. (2020).

Se colocaron 250 μ l de dispersiones acuosas de cada muestra (1 mg proteína ml^{-1}) en un tubo conteniendo 200 μ l de Folin-Ciocalteu y 1250 μ l de agua destilada. Tras la agitación de la mezcla (900 rpm, 15 g) en vórtex modelo Ganie 2 (Scientific Industries, EUA), se dejó reposar 3 min. Posteriormente, se adicionaron 300 μ l de carbonato de sodio (15 % p/v), se dejó incubar (30 min, 23 °C) y se leyó la absorbancia a 760 nm con el espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA.).

Adicionalmente, se preparó una curva estándar de ácido gálico (10 – 80 mg L^{-1}). El contenido de compuestos fenólicos totales se expresó como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) Kg^{-1} de muestra seca.

b) DPPH

Se empleó el procedimiento descrito por de Castro y Sato (2014) con algunas modificaciones. Este método se basó en la estabilidad del radical 2,2-Difenil-1-

picrilhidrazil (DPPH), el cual se empleó para evaluar la actividad antioxidante de las proteínas y sus hidrolizados.

Para el ensayo se realizó una curva con cinco concentraciones diferentes de proteína (mg de proteína mL^{-1}) para cada muestra (sin hidrolizar e hidrolizadas). Se agregaron 275 μL de cada muestra a las diferentes concentraciones (mg de proteína mL^{-1}) en tubos de ensayo, y se agregaron 825 μL de DPPH 0.08 mM diluido en metanol al 80 % (v/v). El blanco se preparó con 825 μL de DPPH 0.08 mM diluido en metanol al 80 % (v/v) y 275 μL de agua destilada. Así mismo se preparó un testigo para cada muestra en sus diferentes concentraciones (mg de proteína mL^{-1}) que contenía 825 μL de metanol al 80 %.

Las muestras se dejaron reposar en oscuridad (60 min, 23 °C). Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Genesys 10S UV–VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA.) a 515 nm. Las mediciones se realizaron por duplicado. El porcentaje de inhibición del radical DPPH se calculó mediante la Ecuación (8).

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \frac{A_{515} \text{Testigo} - (A_{515} \text{Ensayo} - A_{515} \text{Control})}{A_{515} \text{Blanco}} \times 100 \text{ (Ec. 8)}$$

Donde, $A_{515} \text{Testigo}$ es la absorbancia (515 nm) del testigo, $A_{515} \text{Ensayo}$ es la absorbancia (515 nm) del ensayo y $A_{515} \text{Control}$ es la absorbancia (515 nm) del control.

Se preparó una curva estándar de Trolox con concentraciones de 10 - 50 μM y la actividad antioxidante se expresó como mM equivalente TROLOX mg^{-1} proteína.

c) ABTS

Se empleó el método descrito por Reyes et al. (1999) y Zielink et al. (2017). Previo a la evaluación de la actividad antioxidante de las muestras sobre el radical ABTS, se obtuvo dicho radical haciendo reaccionar ABTS 7Mm con persulfato de potasio 2.45 mM el cual se incubó en oscuridad (16 h, 23 °C). Una vez formado

el radical ABTS se diluyó en etanol al 98 % hasta obtener una absorbancia de 700 ± 0.2 nm.

Para el ensayo se realizó una curva de actividad antioxidante con muestras (hidrolizadas y sin hidrolizar) a diferentes concentraciones de proteína. Se agregaron en tubos de ensayo 40 μ L de diferentes concentraciones de cada muestra ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) y 960 μ L de la solución del radical ABTS generado. Así mismo se preparó un control que contenía 960 μ L de la solución del radical ABTS generado y 40 μ L de agua destilada. Aunado a lo anterior, se preparó un blanco que contenía 960 μ L de etanol al 98 % y 40 μ L de agua destilada (0 absorbancia a 734 nm).

Todas las muestras se dejaron reposar en oscuridad (7 min, 23 °C) y transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Genesys 10S UV–VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA.) a 734 nm. El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la Ecuación (9).

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(C_{ABS734} - E_{ABTS734})}{C_{ABS734}} \times 100 \text{ (Ec. 9)}$$

En donde C_{ABS734} es la absorbancia a 734 nm del control y $E_{ABTS734}$ es la absorbancia a 734 nm del ensayo.

Se preparó una curva estándar de Trolox (50-400 μ M) y la actividad antioxidante se expresó como mM equivalente TROLOX mg^{-1} proteína.

3.2.12 Actividad antihipertensiva

Se usó la metodología propuesta por Cushman y Cheung (1971) con algunas modificaciones. Se evaluaron las muestras antes y después de la hidrólisis enzimática.

A 100 μ L de cada muestra (15 mg de proteína ml^{-1}) se dejó reaccionar con 100 μ L de ECA-I (2 mU), incubación (37 °C, 20 min). Posteriormente, se agregaron 200 μ L de sustrato hipuril-histidil-leucina (HHL) 5 mM en amortiguador de borato (0.1

M) pH 8.3, incubación (45 minutos, 37 °C), la reacción se detuvo con la adición de 300 µl de HCl (1 N). A continuación, el ácido hipúrico liberado fue extraído con 1 ml de acetato de etilo y agitación (900 rpm, 15 s) en vórtex modelo Ganie 2 (Scientific Industries, EUA) y la mezcla fue centrifugada (6000 rpm, 10 min, 15 °C).

Posteriormente, del sobrenadante se tomaron 750 µl y colocaron en baño María a 96 °C durante 15 min para evaporar el disolvente. Posteriormente, se agregaron 1.2 ml de agua destilada para resuspender el ácido hipúrico. Por último, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Genesys 10S UV–VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA.) a 284 nm. El porcentaje de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I) se calculó con la Ecuación (10).

$$\% \text{ de actividad inhibitoria ACE} - I = \frac{Abs \text{ testigo} - Abs \text{ muestra}}{Abs \text{ testigo}} * 100 \text{ (Ec. 10)}$$

3.2.13 Análisis estadístico

Se realizaron determinaciones por triplicado y los resultados se expresaron como la media $\pm$ la desviación estándar. El análisis químico proximal, el perfil de aminoácidos, la digestibilidad de proteínas, CRA, CRG, GH, actividad antioxidante y antihipertensiva y compuestos fenólicos totales fueron analizados mediante un diseño completamente aleatorizado, mientras que la CE, CEm, fueron analizados mediante un diseño factorial asimétrico (A x B), donde: A es el factor tratamiento térmico y B es el factor pH. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando en primera instancia un nivel de significancia ($\alpha = 0.05$) y reportando el nivel de significancia muestral para los tratamientos que resultaron significativos. Todos los análisis se llevaron a cabo en software estadístico SAS versión 9.0 (SAS, Institute Inc., Cary, NC, EUA).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Rendimiento en harina de frijol ayocote crudo y cocido

Se obtuvo un rendimiento de harina en frijol ayocote crudo (HFACr) de 71.62 % significativamente mayor ($p \leq 0.05$) que la obtenida a partir de frijol ayocote cocido (HFACo) de 55.78 %. García et al. (2012) reportan un rendimiento mayor (84.79 %) en harina de frijol cocido (*Cajanus cajan*), sin embargo, en este trabajo los rendimientos bajos de harina de frijol cocido se adjudican a la lixiviación de sólidos a través del agua de cocción y su respectiva pérdida tras el proceso de decantado, así como mermas durante el proceso de secado, por la mayor sensibilidad del cotiledón cocido a fragmentarse. Así como lo reporta Jacinto-Hernández et al (1996), quienes asumen un menor rendimiento de harina a partir de frijol cocido debido al proceso de cocción (96 °C, 2 h), secado (40 °C, 48 h), molienda, tamizado y la eliminación de testa del frijol el cual constituye el 11 % del total del frijol.

3.3.2 Caracterización químico proximal

En el Cuadro 4 se presentan los resultados que corresponden al análisis químico proximal realizado a las harinas de frijol ayocote (*P. coccineus* L.), crudo (HFACr) y cocido (HFACo). Los valores exhibidos para el contenido de humedad de las harinas fueron de 6.56 ± 0.08 g agua $\cdot 100$ g⁻¹ HFACr y 7.52 ± 0.13 g agua $\cdot 100$ g⁻¹ de HFACo, sin encontrar diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ellos. Estos valores son menores a los reportados para harina de frijol de diferentes variedades (Mosissa, 2017 y Bernardino-Nicanor 2017). Cabe mencionar que, si las harinas de frijol se almacenan por tiempos prolongados, es deseable un bajo contenido de humedad < 14%, para minimizar el riesgo de contaminación microbiana y/o rancidez hidrolítica, procesos que pueden demeritar las propiedades nutricionales y funcionales de la harina, dado que puede ser materia prima potencial para la elaboración de alimentos fortificados (Estrada-Fabian 2019; Vázquez-Mendoza (2021); Shevkani, et al 2022, Espinosa-Ramírez, et al 2022). Los valores de A_w de las harinas fue de 0.27 ± 0.00 y 0.32 ± 0.01 para

HFACr y HFACo respectivamente, siendo mayor ($p \leq 0.05$) en HFACo. Estos valores bajos, indican que son alimentos de alta vida de anaquel.

El contenido de cenizas fue de $3.68 \pm 0.08 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ HFACr (Cuadro 4), resultado similar a lo reportado por Bernardino-Nicanor et al. (2016), Alvarado-López et al., (2019) y Mengistu (2017) en frijol ayocote, 3.50, 4.04 y 3.99 % respectivamente. Se reconoce que la variación en el contenido de minerales en materiales vegetales es atribuida a las características del suelo y manejo agronómico principalmente. De manera particular, en HFACo, el tratamiento térmico provocó un cambio significativo ($p \leq 0.05$) en el contenido de cenizas (Cuadro 4), dicho comportamiento puede asociarse a la pérdida de minerales mediante lixiviación que ocurrió durante el proceso de cocción, como lo reporta García et al (2019) y Carović-Stanko (2018); sin embargo, se asume que el nivel de lixiviación pudo ser mayor por el proceso de decorticado previo a la cocción del cotiledón.

Por otra parte, se observa (Cuadro 4), que el valor para el extracto etéreo en HFACr fue de $2.84 \pm 0.05 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ harina, menor a lo reportado por Bernardino-Nicanor et al. (2016) (3.50 %), pero mayor a lo reportado por Alvarado-López et al. (2019) (1.61 %) y Mengistu (2017) (0.90 %) en frijol ayocote. El tratamiento térmico mostró un incremento significativo ($p \leq 0.05$) en el contenido de grasa de HFACo ($3.01 \pm 0.02 \%$) (Cuadro 4), esto coincide con lo reportado por García et al. (2019) quienes observaron un aumento de este componente al aplicar tratamiento térmico de 0.9 a 1.1 % en harina de *Phaseolus lunatus*.

El contenido de proteína fue de $21.15 \pm 0.23 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ HFACr (Cuadro 4), valor en el intervalo de 21.7–23.8 g/ 100 g harina, reportado por Jacinto-Hernández et al. (2019), Cruz García (2019) para ayocote morado y Bernardino-Nicanor et al (2017) para variedades de ayocote en México y, menor a lo reportado por Teniente-Martínez et al. (2016) y Mengistu, (2017) en frijol ayocote negro, con el 23.8 y 24.63 % respectivamente. Al aplicar el tratamiento térmico, se observó un incremento significativo ($p \leq 0.05$) en los valores para HFACo de $22.05 \pm 0.15 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (Cuadro 4), comportamiento que coincide con lo reportado por García-

Alanís et al. (2019), quienes mencionan que en el proceso de cocción se incrementa de manera considerable la disponibilidad de la proteína.

Los valores obtenidos para el contenido de fibra en HFACr y HFACr (Cuadro 4) fueron menores en comparación con los reportados por Bernardino-Nicanor et al. (2016) y Alvarado-López et al (2019) en frijol ayocote negro (4.79 y 6.72 %) respectivamente. En esta investigación, las harinas fueron obtenidas a partir de frijol descorticado; siendo que la testa, representa aproximadamente 11 % del total de frijol (Jacinto-Hernández et al., 1996), y su composición en fibra es alta (Velasco-González et al., 2013), lo cual propició la disminución en el contenido de fibra en nuestros tratamientos de harina de frijol ayocote (HFACr y HFACr).

Con respecto al contenido de carbohidratos, la HFACr presentó un $64.4 \pm 0.15 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ harina, mostrando valores similares a lo reportado por Mengistu et al. (2017) y Alvarado-López et al. (2019), mientras que en HFACo se observa una disminución significativa ($p \leq 0.05$) ($63.15 \pm 0.31 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ harina), debido a que este se estimó por diferencia a partir de los valores obtenidos del resto de los componentes. Su comportamiento es el resultado de la variación de dichos componentes.

Cuadro 4. Composición proximal de las harinas del frijol ayocote crudo y cocido.

Composición	HFACr	HFACo
	g $\cdot$ 100 g ⁻¹ harina	
Humedad	6.56 ± 0.08^a	7.52 ± 0.13^a
Cenizas	3.68 ± 0.08^a	2.81 ± 0.21^b
Extracto etéreo	2.84 ± 0.05^b	3.01 ± 0.02^a
Proteína	21.15 ± 0.23^b	22.05 ± 0.15^a
Fibra	1.35 ± 0.03^a	1.44 ± 0.13^a

Carbohidratos*	64.40 ± 0.15 ^a	63.15 ± 0.31 ^b
----------------	---------------------------	---------------------------

Medias en la fila con la misma letra superíndice, no muestran diferencia significativa ($p > 0.05$). *Se determinó por diferencia.

3.3.3 Composición de aminoácidos

Los aminoácidos (AA) se clasifican en esenciales y no esenciales, los cuales además de participar en la biosíntesis de proteínas, son precursores de diversas hormonas, neurotransmisores y otros metabolitos especializados. De esta manera, su consumo regular asegura el crecimiento y las funciones normales del cuerpo, lo que hace necesario su consumo en cantidades suficientes y disponibles (Badui, 2006).

En el Cuadro 5 se reporta el perfil de aminoácidos esenciales y no esenciales para HFACr y HFACo y sus respectivos aislados de proteína. Las concentraciones halladas para harinas de frijol ayocote en esta investigación fueron inferiores a las reportadas en *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus coccineus* por investigaciones previas; sin embargo, se conoce que el contenido de aminoácidos del frijol se determina por las condiciones ambientales de crecimiento y diferencias genéticas (Gundogan & Karaka, 2020; Alcázar-Valle et al., 2021).

Podemos observar en el Cuadro 5 que la cisteína es el aminoácido esencial con residuos de sulfuro, que se presenta en mayor ($p \leq 0.05$) concentración, 891 ± 486 y $1017 \pm 662 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ en HFACr y HFACo; así como 4041 ± 2206 y 4809 ± 3130 en los aislados PFACr y PFACo, respectivamente. Mientras que, dentro de los no esenciales, el ácido glutámico en HFACr ($12.56 \pm 0.37 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ harina) y en HFACo ($11.66 \pm 0.85 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de proteína), supera el índice de consumo recomendado por la FAO ($1.80 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de proteína) (Cuadro 5) para el consumo de personas adultas. Entre los aminoácidos esenciales como leucina, isoleucina, histidina y triptófano y no esenciales como alanina, prolina y tirosina se encuentran concentraciones por debajo de dicha recomendación (Cuadro 5).

Entre los aminoácidos esenciales, lisina y cisteína son los que exhiben valores mayores ($p \leq 0.05$) tanto en HFACr y HFACo como en respectivas proteínas. Altas concentraciones de lisina y cisteína y baja concentración de triptófano están directamente relacionadas con la prevalencia de albúminas y globulinas en las proteínas de las leguminosas (Hojilla-Evangelista et al., 2018).

Entre los aminoácidos no esenciales, el ácido glutámico y aspártico son sobresalientes en su concentración tanto en HFACr, HFACo como en las respectivos aislados de proteína. El ácido glutámico es responsable de la palatabilidad sensorial de muchos alimentos procesados donde se encuentra, pues se libera durante las operaciones de elaboración como la cocción, cambios de pH, hidrólisis enzimática, por fermentación y/o maduración con bacterias, al ingerirse es metabolizado en nuestro sistema gastrointestinal, aporta ATP, pero además puede ser el esqueleto precursor de otros aminoácidos (Brosnan, et al 2013).

Después del tratamiento térmico se observa (Cuadro 5) una disminución significativa ($p \leq 0.05$) de los aminoácidos arginina, asparagina y glutamina, esto se atribuye a una modificación química de las proteínas como la glucosilación, la glucoxidación y la oxidación (Paucar-Menacho et al., 2018).

Cuadro 5. Perfil de aminoácidos de harinas de frijol ayocote crudo (HFACr) y cocido (HFACo) y sus concentrados

Aminoácidos esenciales	mg AA 100 g ⁻¹				Consumo en adultos* mg AA 100 g ⁻¹ de proteína
	HFACr	PFACr	HFACo	PFACo	
Leucina ^A	<1 ± 0.0 ^a	<5 ± 0.0 ^a	<1 ± 0.0 ^a	<5 ± 0.0 ^a	1900
Isoleucina ^A	<1 ± 0.0 ^a	<5 ± 0.0 ^a	<1 ± 0.0 ^a	<5 ± 0.0 ^a	1300
Lisina ^D	529 ± 78.0 ^a	2401 ± 190.0 ^a	557 ± 41.0 ^a	2634 ± 193.0 ^a	1600
Histidina ^D	<1 ± 0.0 ^a	<5 ± 0.0 ^a	<1 ± 0.0 ^a	<5 ± 0.0 ^a	1600
Treonina ^B	36 ± 0.7 ^a	165 ± 3.2 ^a	42 ± 2.8 ^a	199 ± 13.0 ^a	900
Triptofano ^B	2 ± 0.0 ^a	9 ± 0.0 ^a	ND	ND	900
Valina ^A	<1 ± 0.0 ^a	<5 ± 0.0 ^a	<1 ± 0.0 ^a	<5 ± 0.0 ^a	1800
Metionina ^A	<1 ± 0.0 ^a	<5 ± 0.0 ^a	<1 ± 0.0 ^a	<5 ± 0.0 ^a	NR
Cisteína ^B	891 ± 486.0 ^a	4041 ± 2206.0 ^a	1017 ± 662.0 ^a	4809 ± 3130.0 ^a	NR
Fenilalanina ^E	<1 ± 0.0 ^a	<5 ± 0.0 ^a	<1 ± 0.0 ^a	<5 ± 0.0 ^a	NR
No esenciales					
Arginina ^D	222 ± 1.4 ^a	1007 ± 6.4 ^a	119 ± 11.0 ^b	560 ± 5 ^b	500
Arpargina ^B	55 ± 2.8 ^a	249 ± 12.8 ^a	19 ± 4.0 ^b	90 ± 2 ^b	NR
Glutamina ^B	119 ± 7.8 ^a	542 ± 35.2 ^a	11 ± 4.0 ^b	52 ± 2 ^b	NR
Ácido aspártico ^C	1,552 ± 245.0 ^a	7,041 ± 1112.0 ^a	1,631 ± 134.0 ^a	7,709 ± 631.0 ^a	900
Ácido glutámico ^C	2,770 ± 82.0 ^a	12,565 ± 375.0 ^a	2,466 ± 180.0 ^a	11,660 ± 850.0 ^a	1,800
Glicina ^A	178 ± 62.9 ^a	809 ± 285.0 ^a	268 ± 33.0 ^a	1,265 ± 157.0 ^a	200
Serina ^B	565 ± 106.0 ^a	2,565 ± 484.0 ^a	616 ± 75.0 ^a	2,913 ± 354.0 ^a	500

Medias en la fila con la misma letra superíndice, no muestran diferencia significativa ($p > 0.05$). ND: No determinado, NR: No reportados, A: Aminoácidos hidrofóbicos, B: Aminoácidos hidrofílicos, C: Aminoácidos ácidos, D: Aminoácidos básicos, E: Aminoácidos aromáticos, HFACr: Harina de frijol ayocote crudo, HFACo: Harina de frijol ayocote cocido. *(FAO/OMS/UNU, 1985).

3.3.4 Solubilidad

La solubilidad es un parámetro importante dentro de la industria alimentaria, ya que nos permite definir las aplicaciones de los materiales utilizados como materia prima y cómo pueden interactuar con los sistemas alimenticios a los que se incorporen. El nivel de solubilidad de las proteínas también puede relacionarse con sus propiedades tecno-funcionales como su capacidad de retención de agua y aceite, su capacidad espumante, capacidad emulsionante y/o gelificante (Gundogan & Karaca 2020).

Las proteínas de HFACo y HFACr muestran valores de solubilidad en el intervalo de valores de cercanos a los 45 mg de proteína $\cdot \text{ml}^{-1}$ en valores de pH 2, y se reducen de manera significativa ($p \leq 0.05$) a pH 3, mostrando menor solubilidad ($p \leq 0.05$) HFACr, con respecto a HFACo (Figura 9).

El nivel de solubilidad a pH 4 es el menor ($p \leq 0.05$) observado para ambos tipos de harina siendo significativa ($p \leq 0.05$) la diferencia por efecto del tratamiento térmico, 4.913 ± 0.436 mg proteína $\cdot \text{ml}^{-1}$ HFACr y 2.718 ± 0.436 mg proteína $\cdot \text{ml}^{-1}$ para HFACo (Figura 9). Los valores mínimos de solubilidad, posiblemente se atribuyen a la cercanía del pH con el punto isoeléctrico de las proteínas en este tipo de frijol ayocote. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Teniente-Martínez et al. (2016) (pH 4) y Aremu et al. (2008) (pH 4.4) quienes trabajaron con proteínas de frijol ayocote, este pH de menor solubilidad indica el punto isoeléctrico en donde las cargas de los aminoácidos se igualan a cero, generando la precipitación de las proteínas (Kusumah et al., 2020), aunado a lo anterior, el alto contenido de ácido glutámico y aspártico (Cuadro 5) contribuyeron al punto isoeléctrico de las proteínas del frijol en un medio ácido cercano a pH 4 (Gundogan & Karaca, 2020).

Se puede observar (Figura 9), que en el intervalo de pH superior a 4 y hasta 13, la solubilidad de las proteínas provenientes de HFACr y HFACo fue incrementando de manera significativa ($p \leq 0.05$). Los valores de solubilidad para la HFACo superaron los 100 mg $\cdot \text{ml}^{-1}$ a pH 12 y fueron mayores ($p \leq 0.05$) a los

exhibidos por la HFACr, que no supero los $60 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ en el punto de mayor solubilidad; así mismo, a partir de pH 7 la solubilidad de las proteínas de HFACr no mostró variabilidad ($p \leq 0.05$) en función del pH.

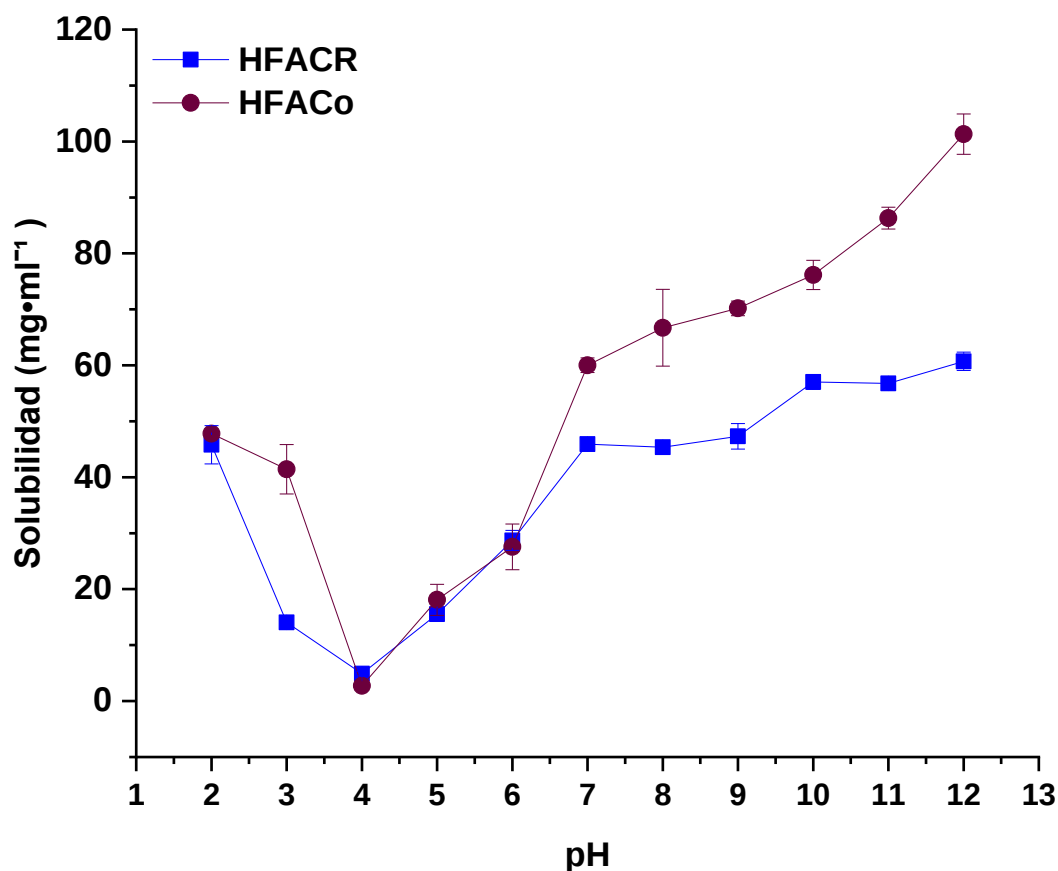


Figura 9. Solubilidad de proteínas de harina de frijol ayocote en función del pH.

Los valores más altos ($p \leq 0.05$) de solubilidad de las proteínas de HFACo se encontraron a pH 12, este resultado coincide con lo reportado por Teniente-Martínez et al. (2019) quienes reportan la mayor solubilidad de proteínas de *Phaseolus coccinus* a este valor de pH. Lo anterior, debido a las interacciones electrostáticas intramoleculares repulsivas, que inducen el despliegue de la molécula proteínica, consecuentemente se promueve la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares entre los péptidos expuestos (Badui, 2006).

La aplicación de un tratamiento térmico al frijol ayocote, propició el aumento de solubilidad, se observa (Figura 9) que en HFACo la solubilidad de las proteínas fue mayor que para HFACr, esto coincide con Tang et al. (2009), quienes aplicaron tratamiento térmico en frijol rojo y mungo durante 30 min a 95 °C, como resultado, observaron que hubo un aumento significativo en la solubilidad en comparación con las no tratadas, sin embargo, en otro estudio realizado en proteínas de *Phaseolus vulgaris* a la misma temperatura (95 °C) aplicando tratamientos térmicos más prolongados (60-120 min) afectaron negativamente disminuyendo su solubilidad (Tang & Ma, 2009).

El incremento de solubilidad en HFACo es atribuido en parte, al aumento en los residuos cargados, inicialmente ocultos en el arreglo estructural de las moléculas, como resultado de la desnaturalización o despliegue de las proteínas, por el contrario, temperaturas más altas y tiempos prolongados pueden afectar negativamente a esta propiedad (Badui, 2006).

3.3.5 Rendimiento proteico de los aislados de proteína

El contenido de proteína en PFACr fue de $56.83 \pm 0.87 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ y en PFACo fue de $71.36 \pm 2.84 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Garg et al. (2020) evaluaron los factores que influyen en la extracción de proteínas en semillas de *Prosopis cinerara* usando metodología de superficie de respuesta, encontrando que el pH, la temperatura y el tiempo de extracción afectan el contenido proteico, lo cual también coincide con lo reportado por Hojilla-Evangelista et al. (2018) quienes obtuvieron valores superiores (79 – 82 %), utilizando diferente temperatura (45 °C) y tiempo de extracción (3 h) a los utilizados en este trabajo.

3.3.6 Digestibilidad proteica

Determinar la digestibilidad de las proteínas es importante debido a que esta nos va a indicar la calidad de las proteínas y el nivel de liberación de los aminoácidos para su posterior absorción en el intestino delgado (Kumar y et al., 2021). Los

métodos *in vitro* con diferentes enzimas emulan la capacidad de hidrólisis en un sistema.

Después de someter a la digestibilidad *in vitro*, las muestras PFACr presentaron valores de digestibilidad de $85 \pm 0.22 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, mostrando un aumento significativo ($p \leq 0.05$) cuando se sometieron los frijoles ayocotes al tratamiento térmico PFACo, con valores de $91 \pm 0.79 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Se ha reportado por Muñoz-Velázquez, et al (2009) intervalos semejantes entre 83.6 a 91.3 para variedades de frijol. Así mismo, reportan que el inhibidor de tripsina presente en leguminosas provoca una baja digestibilidad de la proteína, por lo que una digestibilidad *in vitro* superior al 80%, indica un adecuado tratamiento de inactivación. Así mismo, reportan que la digestibilidad *in vitro* de la proteína aumenta con el secado.

Mariscal-Moreno (2021), evaluaron digestibilidad proteica en panes con incorporación de harinas de frijol ayocote y frijol común, encontrando que la menor digestibilidad proteica fue en las harinas crudas e incrementando en harinas con frijol cocido y en pan. Los procesos agroindustriales a los que son sometidos los frijoles durante su preparación tales como remojo, cocción, fermentación, mejoran la digestibilidad de los nutrientes, biodisponibilidad y calidad nutricional (Gomes-Almeida, et al, 2020). Consideramos que tras el tratamiento térmico del frijol ayocote se inactivaron algunos componentes antinutricionales como taninos, lectinas e inhibidores de tripsina que merman la digestibilidad de las proteínas de leguminosas (Mohan y Mellem, 2020; Gomes-Almeida, et al, 2020), esto puede explicar el aumento en la digestibilidad después del tratamiento térmico. Así también fue reportada mayor digestibilidad para *Phaseolus acutifolius* sometido a cocción por López-Ibarra (2018).

Así mismo, la composición reducida de fibra en harinas de frijol ayocote (cuadro 4), debido al decorticado previo a la cocción pudo favorecer la digestibilidad; Mariscal-Moreno (2021), encontraron una correlación negativa en el contenido de fibra y digestibilidad proteica *in vitro*, un aumento en el contenido de fibra en las formulaciones mostró menor digestibilidad, por lo que consideran que el procesamiento agroindustrial del frijol es fundamental para mejorar el acceso de

las enzimas a la proteína e incrementar la digestibilidad, por lo tanto, su biodisponibilidad.

3.3.7 Potencial Zeta (ζ)

Las interacciones entre los elementos que constituyen un alimento durante el procesamiento, y de manera particular las proteínas, tienen gran relevancia, debido a que estas interacciones son parte de la tecno-funcionalidad de exhiben en el sistema alimenticio; tales como la estabilización de espumas, emulsiones y su estabilidad; la textura que exhiba cuando sea consumido, así como, la biodisponibilidad de los ingredientes bioactivos que contenga (Cano-Sarmiento, et al., 2018); por lo que, estudiar los cambios en su densidad de carga, repulsión electrostática, interacciones químicas; favorece su comprensión y que sean tomados en cuenta en la formulación y diseño de nuevos productos y/o procesos (tratamientos térmicos, secado por aspersion, liofilizado, homogenización, altas presiones).

La carga promedio de las proteínas generalmente se mide como potencial Zeta (ζ), el cual tiene la finalidad de determinar la interacción entre una partícula específica con otras de carácter coloidal, a través de fuerzas de repulsión y atracción y de esta manera se puede medir la estabilidad de las dispersiones coloidales (Gundogan & Karaca, 2020). Las proteínas provenientes de harina de frijol ayocote crudo y cocido (PFACr y PFACo) tuvieron una carga superficial que surge principalmente de las regiones peptídicas expuestas, y de manera particular de la ionización de los grupos superficiales de los aminoácidos; sin embargo, tras pequeños cambios en el pH, pueden ocurrir cambios conformacionales en la proteína que puede afectar su actividad.

La Figura 10 muestra los valores de potencial Z (ζ) que se obtuvieron de las proteínas de frijol ayocote para cada tratamiento. Respecto a PFACr, los valores se encontraron en el intervalo de 18.07 ± 0.32 mV (pH 3) a -26.43 ± 2.51 mV (pH 7) y para PFACo los valores oscilaron de 18.83 ± 0.35 (pH 3) a -25.20 ± 0.7 (pH 7), los resultados obtenidos en este estudio son similares a los que presentaron

Gundogan y Karaca (2020) para proteínas de *Phaseolus coccineus*, presentando valores de 23.7 mV (pH 3) y -20.4 (pH 7).

En todos los puntos del intervalo de pH evaluados, existió diferencia significativa entre los valores de potencial z para PFACr y PFACo, lo que demuestra un efecto del tratamiento térmico sobre las proteínas. Entre pH 4 y 4.5, pueden observarse los valores más cercanos a cero, indicando que las cargas se encuentran neutralizadas casi en totalidad, coincidiendo con su limitada solubilidad de las proteínas (Figura 9).

Por otro lado, a partir de pH 4.5 se muestran (Figura 10) valores negativos en el potencial (ζ) para ambas PFACr y PFACo y, después de pH 4.5 hasta 7, muestran una carga superficial negativa mayor ($p \leq 0.05$); esto probablemente a que el perfil de aminoácidos del frijol ayocote, el ácido glutámico y aspártico se encuentran en mayor concentración (Cuadro 5), es decir, el ácido glutámico y aspártico por debajo de su pI (3.22 y 2.97), se encuentran en su forma protonada a medida que el pH aumenta y rebasa el pI, comienzan a desprotonarse (la forma aniónica) adquiriendo así una carga negativa (Badui, 2006).

Así mismo, el desdoblamiento ocurrido en las proteínas a causa del tratamiento térmico expuso más residuos de aminoácidos ácidos, por consiguiente, el aumento de la carga superficial neta negativa de las proteínas (Porrás-Godínez et al., 2015). Fasolin y Cunha (2013), caracterizaron aislados de proteína de soya, encontrando valores de pI entre 4 y 5, con valores de potencial zeta negativos de -10 a -30 en el intervalo de pH de 3 a 7.

Además, con este análisis se logró identificar el pI para cada muestra, en PFACo a pH 4.4 y en PFACr a pH 4, en estos puntos, las proteínas igualan su número de cargas positivas y negativas, por lo que su carga neta es cero, por lo tanto, las fuerzas de atracción entre partículas son mayores, por consiguiente, se supera la repulsión y conduce a la agregación de las mismas (Mayoral et al., 2014). Posteriormente, a medida que los valores del potencial Z (ζ) se alejan de

cero, las partículas comienzan a estabilizarse en la dispersión evitándose así la agregación de las proteínas.

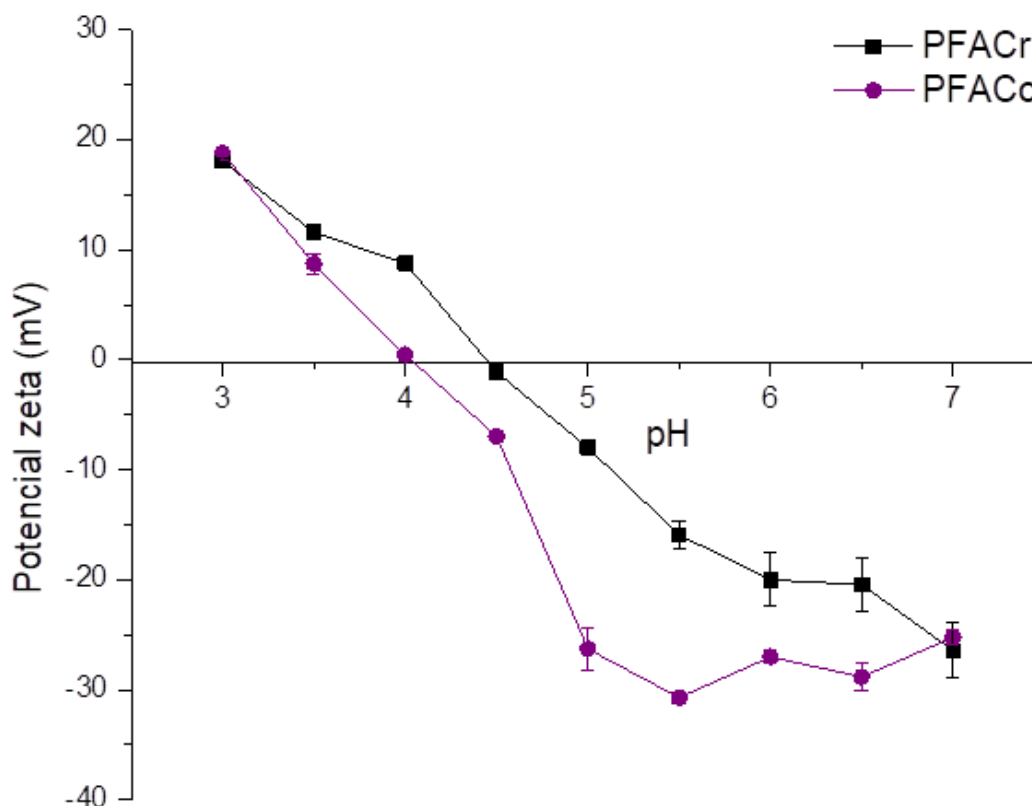


Figura 10. Potencial Z (ζ) de los concentrados de proteína de frijol ayocote crudo (PFACr) y cocido (PFACo) como función del pH

3.3.8 Propiedades tecno-funcionales

a) Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (CRA) es definida como la cantidad de agua retenida en un material hidratado al ser sometido a una fuerza externa, por lo que es la suma del agua enlazada, agua hidrodinámica y agua atrapada físicamente siendo la última la que mayor contribución aporta en esta propiedad (Vegas et., 2017). La muestra HFACr presentó una absorción de agua de 1.38 ± 0.06 g de agua $\cdot$ g⁻¹ de harina. Estos valores coinciden con los reportados por Granito et al.

(2009) (1.70 y 1.89 g de agua/g harina) pero son menores a los reportados por Siddiq et al. (2010) (2.23 y 2.65 g de agua/g harina) para *Phaseolus vulgaris*.

Después del tratamiento térmico, la absorción de agua en HFACo fue de 2.28 ± 0.15 g agua $\cdot$ g⁻¹ de harina, observándose un incremento significativo ($p \leq 0.05$), similar a lo reportado por Navarro y López (2019) (2.57 g de agua/ g de harina) en *Phaseolus vulgaris* sometido a tratamiento térmico, pero menor a lo reportado por Granito et al. (2009) (2.73 - 4.41 g de agua/ g de harina) en *Phaseolus vulgaris* cocido.

El incremento en la capacidad de retención de agua (CRA) después de la cocción del frijol, puede ser atribuido a una desnaturalización o desdoblamiento de las proteínas del frijol como efecto del tratamiento térmico aplicado, lo que permitió el acceso del agua a los residuos de aminoácidos polares, los cuales tienen gran afinidad por el agua. Aunado a lo anterior, la gelatinización del almidón tras la cocción y el hinchamiento de la fibra dietética contenidos en la HFACo, contribuyeron a la retención de agua y por lo tanto el incremento en esta propiedad funcional (Granito et al., 2009).

Por otra parte, la CRA en PFACr fue de 4.24 ± 0.18 g agua $\cdot$ g⁻¹ proteína, y redujo en proteína proveniente de frijol ayocote con tratamiento térmico PFACo a 2.51 ± 0.04 g agua $\cdot$ g⁻¹ proteína, presentando diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$). Estos valores son mayores a los reportados por Gundogan y Karaca (2020) en proteínas de *Phaseolus coccineus* (2 g de agua/g de proteína) evaluada a pH 4.5.

La muestra PAFCr posee mayor capacidad de interaccionar con el medio acuoso debido a su mayor carga superficial (Figura 10), al pH de evaluación y la retención de agua es mayor cuando los aminoácido se encuentra en forma ionizada, por lo que, a medida que haya una mayor concentración de aminoácidos cargados, la retención de agua será mayor (Miquilena et al., 2016), tal como lo reportaron Wani et al. (2015), quienes encontraron mayor retención de agua (5.34 – 5.83 g de agua/ g de aislado) en proteínas de *Phaseolus vulgaris* L. evaluadas a pH 7.

Aunado a lo anterior, considerando la pureza de PFACr, es posible que la presencia de carbohidratos haya aumentado la retención de agua, debido a que se ha demostrado que la presencia de estos componentes mejora dicha propiedad (Hojilla-Evangelista et al., 2018).

b) Capacidad de retención de aceite

La capacidad de retención de aceite (CRG) de un alimento está relacionada con el número de cadenas laterales no polares de las proteínas que se enlazan con cadenas hidrocarbonadas de los lípidos (Vegas et. al, 2017). Los valores de CRG en harinas de frijol ayocote fueron de 0.68 ± 0.04 y 0.66 ± 0.05 g aceite• g⁻¹ de harina para HFACr y HFACo respectivamente, sin encontrar diferencia significativa ($p > 0.05$). Los valores son menores a lo reportado por Siddiq et al. (2010) (1.23 - 1.52 g de aceite/ g de harina) en *Phaseolus coccineus*. El mismo comportamiento fue encontrado para la capacidad de retención de aceite en PFACr y PFACo con valores 0.58 ± 0.03 y 0.59 ± 0.05 g aceite• g⁻¹ de proteína respectivamente, sin presentar diferencia significativa ($p > 0.05$), estos resultados fueron menores a los reportados por Gundogan y Karaca (2020) (4.0 - 5.4 g de aceite/ g aislado) en proteínas de *Phaseolus coccineus* y *Phaseolus vulgaris*.

La diferencia que se presenta en los valores de retención de aceite puede ser debido a la presencia de cadenas laterales no polares de los aminoácidos que conforman las proteínas las cuales interaccionan con las cadenas hidrocarbonadas de lípidos (Li et al., 2010), además de factores como la microestructura o tamaño de partícula que limitan la retención de agua y aceite. Aunado a lo anterior, la mayor interacción entre proteínas efectuada en pH cercanos al pI evita la mayor adsorción de aceite, haciendo que esta propiedad disminuya (Du et al., 2017).

Las proteínas al tener propiedades anfífilas tienen la capacidad de interactuar con el agua y el aceite siendo estas macromoléculas las que influyen principalmente en el aumento o reducción de estas propiedades en los alimentos. Este comportamiento puede determinar la estabilidad sensorial y de

almacenamiento en formulación de bebidas, panadería, productos cárnicos entre otros (Alfaro-Díaz et al., 2020).

c) Capacidad y estabilidad espumante

Tras evaluar la capacidad espumante (CE) en HFACr y HFACo a diferentes valores de pH, se presentó diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$). En la Figura 11 A se muestra que a pH 6 tuvo una CE de 53.3 ± 5.8 ml espuma• 100 ml^{-1} de dispersión de HFACr, similar a lo reportado por Granito et al. (2004) en harina de *Vigna sinensis* (59 %) y superiores en harina de cuatro variedades de *Phaseolus vulgaris* (20 - 41.05 %) reportados por Granito et al., 2009. A pH 3 se logra observar (Figura 11A) una disminución de la capacidad espumante obteniéndose 40 ± 0.0 ml espuma• 100 ml^{-1} de dispersión de HFACr similar a lo reportado por Sangronis y et al. (2004) *Phaseolus vulgaris* a pH 3 (36.7 - 45 %).

La solubilidad de la proteína se encuentra estrechamente relacionada con la propiedad tecno-funcional espumante (Teniente et al, 2019), así podemos observar en la Figura 9, que conforme se acerca al valor del pI se reduce significativamente su solubilidad, y por tanto, afecta de manera negativa la CE en HFACr.

El tratamiento térmico aplicado a frijol ayocote, afectó negativamente la propiedad espumante de la harina, debido a que a pH 6 se formó solo 10 ± 0.0 ml de espuma• 100 ml^{-1} de dispersión de HFACo y a pH 3 no hubo formación de esta, lo anterior coincide con los resultados reportados por Granito et al. (2004) y García et al. (2019), quienes obtuvieron 59 y 14 % de espuma en harina cruda y 8 y 3.2 % respectivamente después del tratamiento térmico. La desnaturalización de las proteínas mediante su agregación y precipitación, la proporción de regiones hidrofóbicas e hidrofílicas; así como las restricciones estructurales de las mismas evitan su absorción en la interfase aire-agua de la espuma (Boye et al., 2010).

Por otra parte, la CE de las proteínas PFACr y PFACo se observa en la Figura 11 B, la proteína de HFACr formó $64.62 \pm$ y $70.13 \pm$ ml espuma• 100 ml⁻¹ de solución de PFACr a pH 3 y 6, respectivamente, similar a lo reportado por Wani et al. (2015) en proteínas de *Phaseolus vulgaris* (76 – 96 %) a pH 6. Al encontrarse una gran influencia de la solubilidad sobre la CE, puede observarse en la Figura 9, la solubilidad de PFACr fue mayor ($p \leq 0.05$) a pH 6 que a pH 3, teniendo este mismo comportamiento en la CE. Se ha reportado que las proteínas de frijol tienen una CE y una estabilidad bajas o moderadas que se atribuyen a su estructura compacta y rígida (Hojilla-Evangelista et al., 2018). Por otro lado, a pH superior a pH 6 y hasta 12, región donde se observó mayor solubilidad ($p \leq 0.05$) de las proteínas de ayocote PFACr y PFACo (Figura 9), se observó también mayor CE ($p \leq 0.05$) a pH 6.

La CE aumentó significativamente ($p \leq 0.05$) después del tratamiento térmico a 79.17 ± 1.2 y 86.67 ± 3.85 ml espuma• 100 ml⁻¹ de solución de PFACo a pH 3 y pH 6 respectivamente (Figura 11 B). El despliegue de las proteínas efectuado por el tratamiento térmico permite la exposición de regiones hidrófobas y/o residuos de aminoácidos hidrofóbicos que se orientan a la fase dispersa de la espuma formando una membrana interfacial y mejora dicha propiedad (Akharume et al., 2021), además PFACo presenta mayor ($p \leq 0.05$) carga superficial neta a pH 6 (-27 ± 0.61 mV) y 3 (18.83 ± 0.35) que PFACr a pH 6 (-20 ± 2.41) y 3 (18.06 ± 0.32) (Figura 10), la cual influye directamente sobre esta propiedad, al reducir las interacciones hidrofóbicas y evitando la agregación de las mismas (Gundogan & Karaca, 2020).

Las proteínas solubles del frijol (albúminas y globulinas) tienen la capacidad de reducir la tensión superficial que se encuentra en la fase dispersa (aire) y la fase continua (agua), desplegándose e interactuando entre sí para formar películas de proteínas multicapa con una mayor flexibilidad en la interfase aire-líquido manteniendo así mismo su estabilidad (Chaparro et al., 2014).

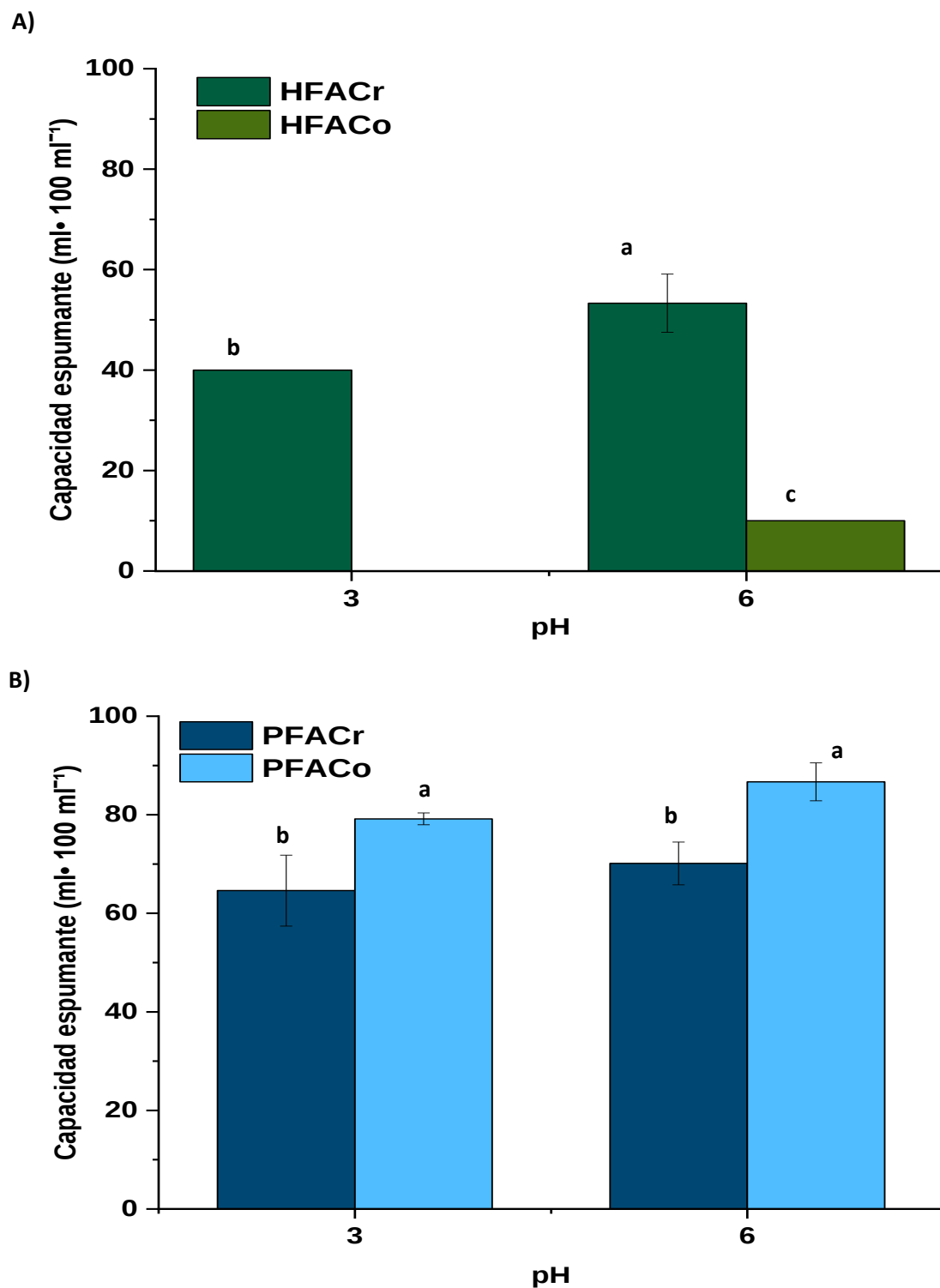


Figura 11. Capacidad espumante. A) harina de frijol ayocote crudo (HFACr) y harina de frijol ayocote cocido (HFACo) y B) proteínas de frijol ayocote crudo (PFACr) y proteínas de frijol ayocote cocido (PFACo), a diferente pH.

Respecto a la estabilidad de espuma (EEs) de las harinas HFACr y HFACo, en la Figura 12 A. Se observa mayor ($p \leq 0.05$) estabilidad a pH 6 en HFACr mientras que a pH 3 hubo colapso total a los 30 min. Por su parte, a pH 6 en HFACo a los 5 min ya se había desestabilizado la espuma, lo anterior coincide con Granito et al. (2004), quienes observaron que al aplicar tratamiento térmico en *Vigna sinensis* la estabilidad espumante fue menor con respecto al que no tuvo tratamiento, se ha informado que la formación y estabilidad de la espuma es afectada por la presencia de lípidos (Niño et al., 2017).

Con respecto a las proteínas, en la Figura 12 B se observa que, a los 15 min, PFACo a pH 6 mostró menor ($p \leq 0.05$) estabilidad (46.35 ± 2.72 ml espuma • 100 ml^{-1} de solución de PFACo), mientras que las demás muestras mantenían entre $84.00 - 88.00$ ml espuma • 100 ml^{-1} de solución de proteína sin presentar diferencia significativa ($p \leq 0.05$). La diferente estabilidad de cada muestra pudo haberse producido por la proximidad de cada una a su pI , en donde la carga neta es cero, por lo que, al no haber repulsión entre ellas mejora su interacción permitiendo la formación de una película con mayor contenido de proteína en la interfase (Wani et al., 2015).

A diferencia de la capacidad espumante que depende de la velocidad de adsorción, la flexibilidad y la hidrofobicidad de las proteínas para poder interactuar con la interfase aire agua, la estabilidad de espuma dependerá de la película proteica que rodea a la espuma y al tamaño de esta, se ha reportado que espumas de tamaño más pequeño resisten más a la deformación y por consiguiente al colapso (Martínez-Velasco et al., 2018).

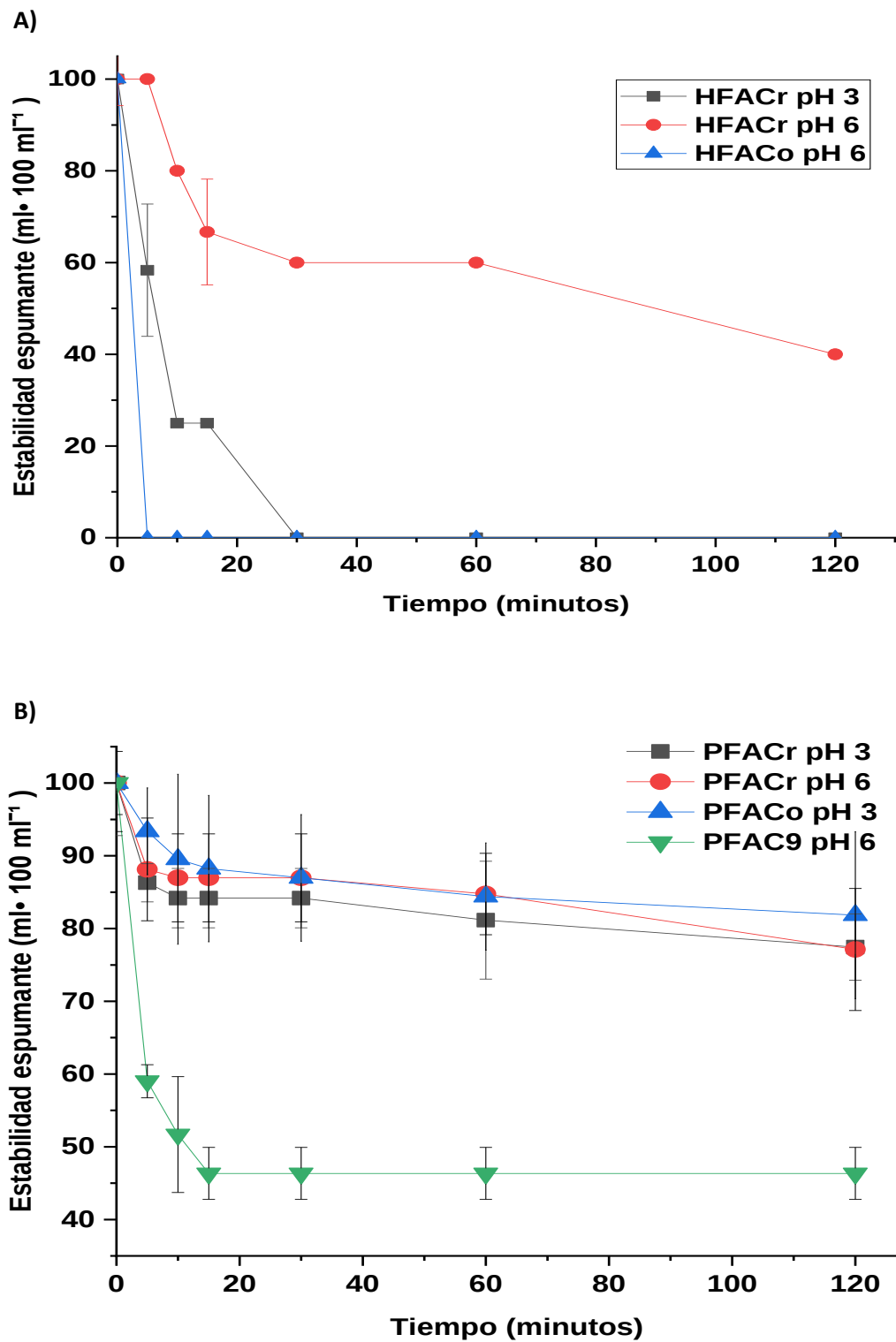


Figura 12. Estabilidad espumante. A) harina de frijol ayocote crudo (HFACr) y harina de frijol ayocote cocido (HFACo) y B) proteínas de frijol ayocote crudo (PFACr) y proteínas de frijol ayocote cocido (PFACo), a diferente pH.

d) Capacidad emulsionante

La capacidad emulsionante (CEm) de las harinas HFACr y HFACo se observa en la Figura 13 A, la HFACr pH 3 presentó 58.73 ± 1.46 g aceite• 100 g⁻¹ harina y a pH 6, 50 ± 0.0 g aceite• 100 g⁻¹ harina (Fig 13 A), estos valores similares reportaron Siddiq et al. (2010) en *Phaseolus vulgaris* (45.5 a 60.5 %). La CEm dependerá del tamaño, flexibilidad, carga y extensión de las regiones hidrofóbicas de las proteínas, así como del pH y fuerza iónica del medio y los complejos que se forman entre proteínas y polisacáridos, mejorando el volumen y estabilidad de emulsión debido a los efectos de repulsión estérica que se generan por la modificación de las cargas eléctricas de los polímeros (Hojilla-Evangelista et al., 2018).

En HFACo se observa (Figura 13 A) una disminución significativa ($p \leq 0.05$) a pH 3 (18 ± 2.65 g aceite• 100 g⁻¹ harina) y 6 (41.66 ± 2.89 g aceite• 100 g⁻¹ harina) respecto a los valores que mostró HFACr, dicho comportamiento es similar a lo reportado por García y et al. (2019) en harina de *Phaseolus lunatus* crudo (43.8 %) y cocido (6.5 %), el aumento en el contenido de fibra en HFACo pudo haber influenciado en dicha disminución ya que se ha reportado que algunos alimentos ricos en fibra no tienen la capacidad de formar emulsiones, debido a que esta depende de sus grupos hidrofílicos y lipofílicos presentes en sus componente (Ramírez y Pacheco, 2009).

Respecto a la CEm de las proteínas (PFACr y PFACo), en la Figura 13 B, se observa que el tratamiento térmico no influyó de manera significativa ($p > 0.05$) sobre esta propiedad, contrariamente al pH, habiéndose efectuado mayor ($p \leq 0.05$) porcentaje de emulsificación a pH 6, 80.95 ± 8.2 y 76.19 ± 4.1 g aceite• 100 g⁻¹ PFACo PFACr respectivamente con respecto a el pH 3 donde se obtuvieron valores de CEm fueron menores ($p \leq 0.05$) (Figura 13 B).

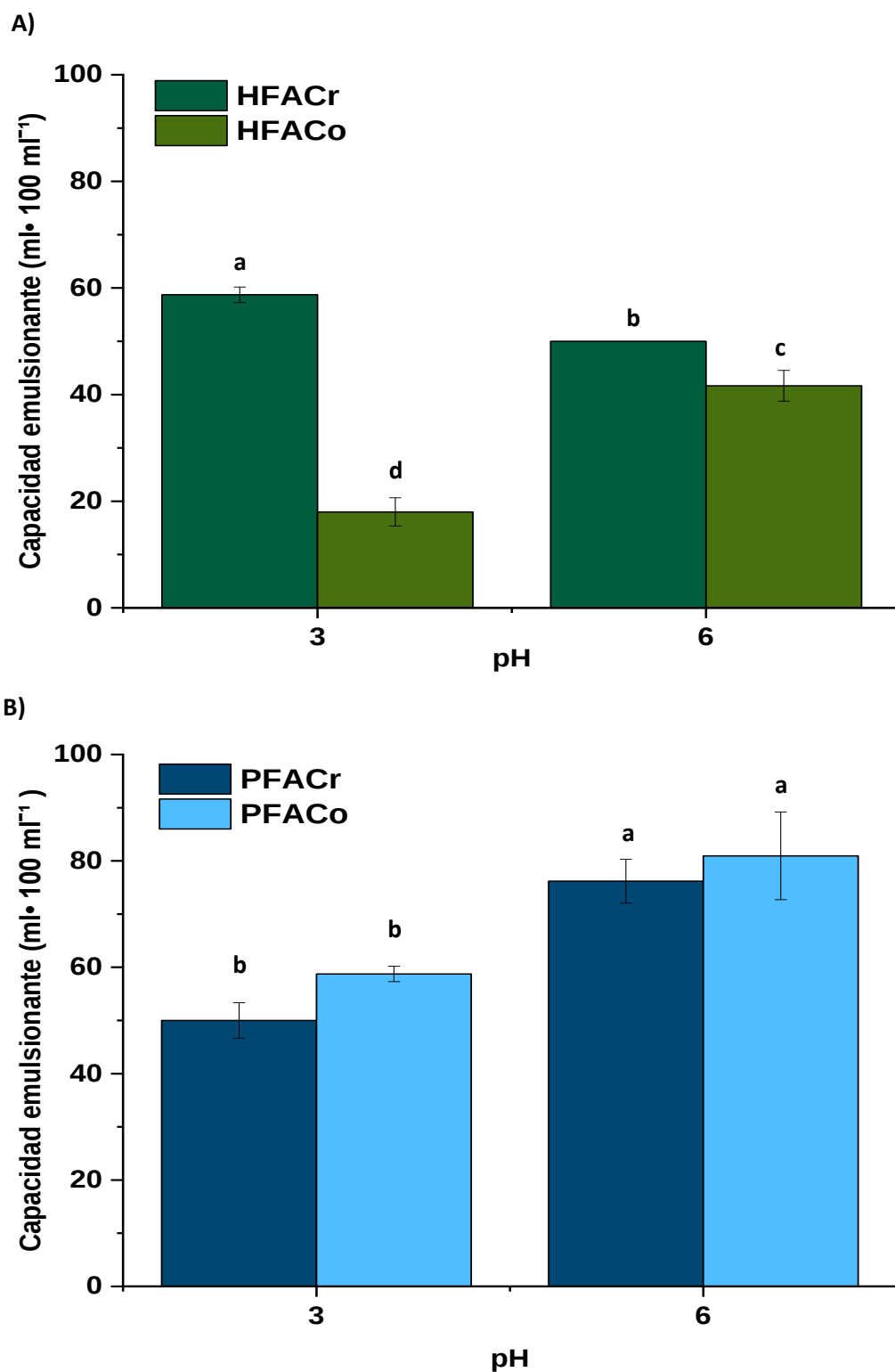


Figura 13. Capacidad emulsionante. A) harina de frijol ayocote crudo (HFACr) y harina de frijol ayocote cocido (HFACo) y B) proteínas de frijol ayocote crudo (PFACr) y proteínas de frijol ayocote cocido (PFACo), a diferentes pH.

Gundogan y Karaca (2020) observaron que los aislados con carga neta y solubilidad significativamente más altas de las proteínas, además de su contenido de aminoácidos hidrofóbicos mejoran la CEm de las proteínas, mientras que, Hojilla-Evangelista et al. (2018) observaron que dicha propiedad mejora a medida que las proteínas se alejan de su pI debido a que se efectúa una mayor repulsión entre proteínas, permitiendo así la formación de gotas más pequeñas, las cuales también permiten mayor estabilidad en la emulsión.

Además de las características estructurales de las proteínas, las emulsiones también van a depender de factores extrínsecos como: pH, fuerza iónica, temperatura, azúcares presentes y volumen de la fase oleosa del medio, el tipo de equipo utilizado para formar la emulsión, la velocidad de incorporación del aceite y el nivel de agitación (Badui, 2006).

e) Capacidad gelificante

En concentraciones de proteína de frijol ayocote $\leq 10 \text{ g} \cdot 100 \text{ ml}$ dispersión, se forman geles muy débiles con gran tendencia a fluir, mostrando un comportamiento viscoelástico predominante.

La concentración mínima de gelificación (CMG) requerida para ambas muestras fue de $12 \text{ g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ dispersión. Los resultados obtenidos (Figura 14 A y 14 B), son similares a los obtenidos por Granito et al. (2004), quienes evaluaron las propiedades gelificantes de proteínas de *Vigna Sinensis* observando que se requiere una CMG de 14 % (p/v), mientras que Gundogan y Karaca (2020) requirieron concentraciones más bajas (8 - 10 % p/v) en proteínas de diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus coccineus*.

La temperatura de calentamiento es uno de los factores que influyen en la formación de gel, debido a que la desnaturalización que se produce debido al tratamiento térmico aplicado a las proteínas que permite un cambio de conformación de la proteína a una conformación desplegada en donde los grupos funcionales como sulfihidrilos o hidrofóbicos quedan expuestos interactuando

entre sí hasta formar agregados, a medida que la concentración aumenta la agregación de las proteínas permite la formación del gel (Renkema, 2001).

Además del tratamiento térmico, la gelificación de las proteínas también se verá afectada por el pH del medio, sales y otros aditivos, se ha reportado que el pH óptimo para la formación de geles está entre 7 y 8 para la mayor parte de las proteínas, siendo el pH 7 el más utilizado para la evaluación de esta propiedad en proteínas de diferentes especies de frijol (Gundogan & Karaca et al., 2020; Granito et al., 2004; He et al., 2020; Tan et al., 2014).

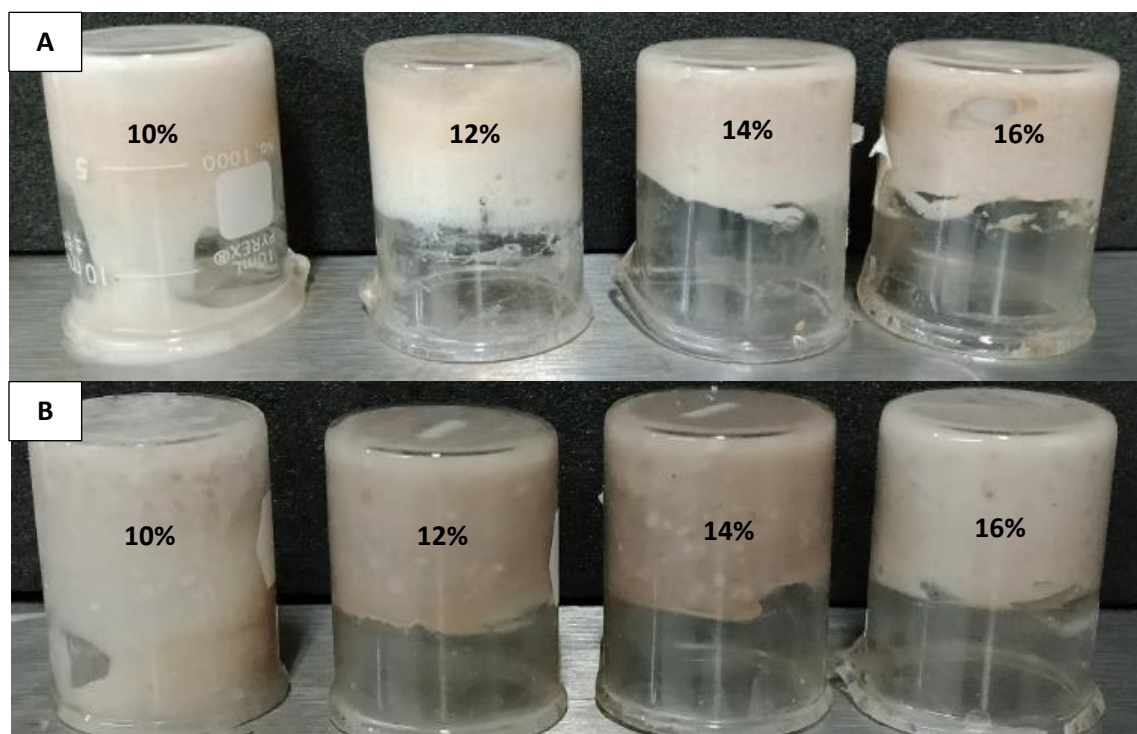


Figura 14. Capacidad gelificante. A) proteínas de frijol ayocote crudo (PFACr) y B) proteínas de frijol ayocote cocido (PFACo), a diferentes concentraciones.

3.3.9 Hidrólisis enzimática

El grado de hidrólisis indica el grado de modificación estructural que tiene una proteína nativa a través de la generación de nuevos péptidos de menor peso molecular, además estima el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos durante la reacción enzimática (Gasca-Tuz et al., 2017).

El GH respecto a los grupos amino terminal en PFACr fue de 12.60 ± 0.33 %, mientras que en PFACo se obtuvo el 48.4 ± 5.70 %, presentándose diferencia significativa ($p \leq 0.05$). El tratamiento térmico permitió el desdoblamiento de las moléculas de proteínas debido a un aumento en la energía cinética que interrumpe las interacciones covalentes y no covalentes dando como resultado una mayor accesibilidad de las enzimas al sustrato generando una mayor tasa de escisión (Mojica et al., 2014).

Lo anterior coincide con lo reportado por Mojica et al. (2014) quienes encontraron mayor grado de hidrólisis en proteínas de *Phaseolus vulgaris* precocido (>35 %) que en el crudo (<35 %), así mismo, Torres et al. (2016) hidrolizaron proteínas de diferentes leguminosas sometidas a diferentes tratamientos térmicos, como resultado obtuvieron que solo las que se sometieron a tratamientos térmicos prolongados aumentaron el grado de hidrólisis de sus proteínas.

El grado de hidrólisis en PFACo (48.4 %) fue mayor a lo reportado por Ciau-Solís et al. (2017) (33.2 %), Polanco-Lugo et al. (2014) (15.9 %) y Gasca-Tuz et al. (2017) (20.54 %) en aislados de proteínas de *Phaseolus lunatus*, en una hidrólisis secuencial de pepsina pancreatina, con 90 y 60 min de reacción, mientras que Castañeda Pérez et al. (2019) obtuvieron un grado de hidrólisis de 23.12 % en proteínas de frijol *Vigna unguiculata* con 90 min de reacción.

Los péptidos generados de las proteínas del frijol ayocote representan un grupo de péptidos que se asemejan a los péptidos que se generan durante la digestión gastrointestinal de las proteínas en nuestro organismo, debido a que la pepsina es una enzima proteolítica que se genera en el estómago durante la digestión de los alimentos, mientras que en el páncreas se liberan proteasas como la tripsina, quimotripsina y elastasa, de las cuales está compuesta la pancreatina (Tovar-Benítez et al., 2020).

3.3.10 Actividad antioxidante

a) Compuestos fenólicos totales (CFT)

En la figura 15 se observa que en todas las muestras presentaron CFT. De manera general, los valores exhibidos fueron inferiores a los reportados por Alvarado-López et al. (2019) (1292.24 - 2075.91 mg EAG/Kg) quienes trabajaron en diferentes variedades de frijol ayocote entero. Es importante aclarar, que se ha reportado que aproximadamente el doble de la concentración de estos compuestos se encuentra en la testa que en cotiledón (Quiroz-Sodi et al., 2018), por lo que la concentración encontrada en las proteínas de ayocote (PFACr y PFACo) corresponde únicamente a la fracción del cotiledón.

Se observa en la figura 15, un valor previo a la hidrólisis de 15.55 mg EAG •Kg⁻¹ PFACr, mientras que en PFACo se obtuvo un valor de 25.07 mg EAG•Kg⁻¹ PFACo significativamente mayor ($p \leq 0.05$, que puede ser atribuido al tratamiento térmico, Rodríguez-Salinas et al. (2021) encontraron que mediante el proceso de pasteurización en maíz, la concentración de compuestos fenólicos aumentaron, esto se debe probablemente a que con el tratamiento térmico se rompen enlaces covalentes de los compuestos fenólicos convirtiéndolos en compuestos fenólicos de alto peso molecular a compuestos fenólicos de bajo peso molecular, lo anterior puede justificar el aumento en el contenidos de compuestos fenólicos en la muestra PFACo.

Después de la hidrólisis enzimática, los valores de CFT en PFACr aumentaron significativamente ($p \leq 0.05$) a 20.68 mg EAG•Kg⁻¹ PFACr. En el frijol, el mayor contenido de compuestos fenólicos en su fracción ligada se encuentra unido covalentemente a los componentes estructurales de la pared celular, como la celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina y proteínas estructurales (Rochín-Medina et al., 2021), después de la hidrólisis aplicada a las proteínas ocurre una disociación de los complejos proteína-polifenol permitiendo la liberación de fragmentos de péptidos asociados con los polifenoles, tal como lo reportan Roy

et al. (2019) en proteínas hidrolizadas de *Phaseolus vulgaris*, esto justifica el mayor contenido de CFT después de la hidrólisis en PFACr.

Sin embargo, después del proceso de hidrólisis, el CFT en PFACo disminuyó de manera significativa ($p \leq 0.05$) a 17.53 mg EAG•Kg⁻¹ PFACo, Este comportamiento fue reportado también por Almanza et al (2008), para frijol negro sometido a cocción que tuvo una reducción del 50% en el CFT; y por Diaz et al, (2006) al analizar variedades silvestres y cultivares de frijol mexicano reportando reducciones significativas en quercetina y kaempferol, esto puede ser debido a que en el tratamiento térmico existe modificación de los fenoles.

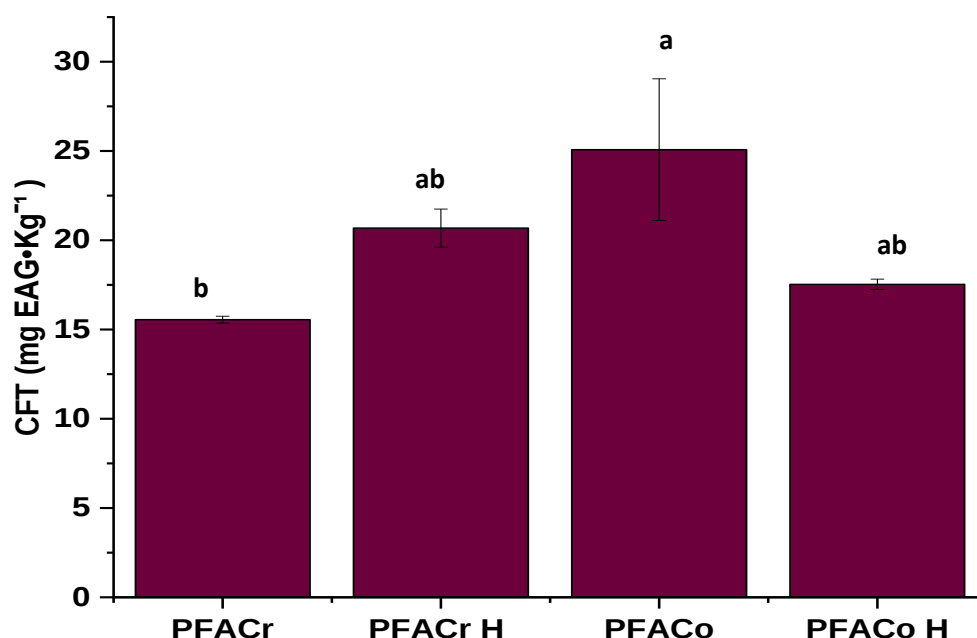


Figura 15. Contenido de compuestos fenólicos totales. PFACr: proteínas de frijol ayocote crudo. PFACr H: Proteínas hidrolizadas de frijol ayocote crudo. PFACo: Proteínas de frijol ayocote cocido. PFACo H: Proteínas hidrolizadas de frijol ayocote cocido.

Estos resultados indican que, parte de la actividad antioxidante de las muestras es debido a los CFT encontrados en cada una de ellas, debido a que se ha informado que el frijol posee elevada actividad antioxidante, a causa de la

presencia de altas cantidades de compuestos fenólicos, principalmente antocianinas y taninos condensados (Bedoya y Maldonado, 2022).

b) DPPH

La actividad antioxidante las proteínas y sus hidrolizados es definida como su capacidad para reaccionar con el radical DPPH de modo que se transforme en una forma no radical, esto es a través de la eliminación de radicales por la donación de electrones (Wijatniko y Murdiati, 2019).

La PFACr mostró un valor de capacidad antioxidante (TEAC) de 0.016 ± 0.00 mM eq TROLOX mg^{-1} proteína, después de la hidrólisis enzimática no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$), obteniendo un valor TEAC de 0.015 ± 0.00 mM eq TROLOX mg^{-1} proteína, similar a lo reportado por Valdez-Ortiz et al. (2012) ($0.014 - 0.027$ mM/mg proteína) quienes trabajaron en hidrolizados de proteína de *Phaseolus vulgaris*. En cambio, la muestra PFACo presentó un valor de TEAC de 0.027 ± 0.00 mM eq TROLOX mg^{-1} proteína y después de la hidrólisis enzimática se observa una disminución significativa ($p \leq 0.05$) a 0.009 ± 0.00 mM eq TROLOX mg^{-1} proteína (Figura 16 A).

Aunado a lo anterior, para determinar la actividad antioxidante potencial de las muestras estudiadas se calculó el IC_{50} , definido como la concentración necesaria para inhibir el 50 % de la actividad del radical DPPH. La muestra PFACr requiere una concentración de 2.32 ± 0.03 mg proteína y esta disminuye después de la hidrólisis enzimática a 1.86 ± 0.05 mg proteína, mientras que la muestra PFACo requiere 1.12 ± 0.00 mg proteína y después de la hidrólisis, 1.50 ± 0.05 mg proteína para inhibir el 50 % del radical DPPH (Figura 16 B).

La actividad antioxidante de los hidrolizados depende principalmente de la estructura primaria de los péptidos presentes, siendo las enzimas las que determinan dicha estructura, se ha encontrado que a través de la hidrólisis secuencial con pepsina-pancreatina se han generado péptidos con actividad antioxidante, los cuales, a menudo incluyen restos de aminoácidos hidrofóbicos

como valina, leucina en el aminoácidos terminal, así como Pro, His, Tir, Met y Cis en sus secuencias (Gallegos et al., 2013).

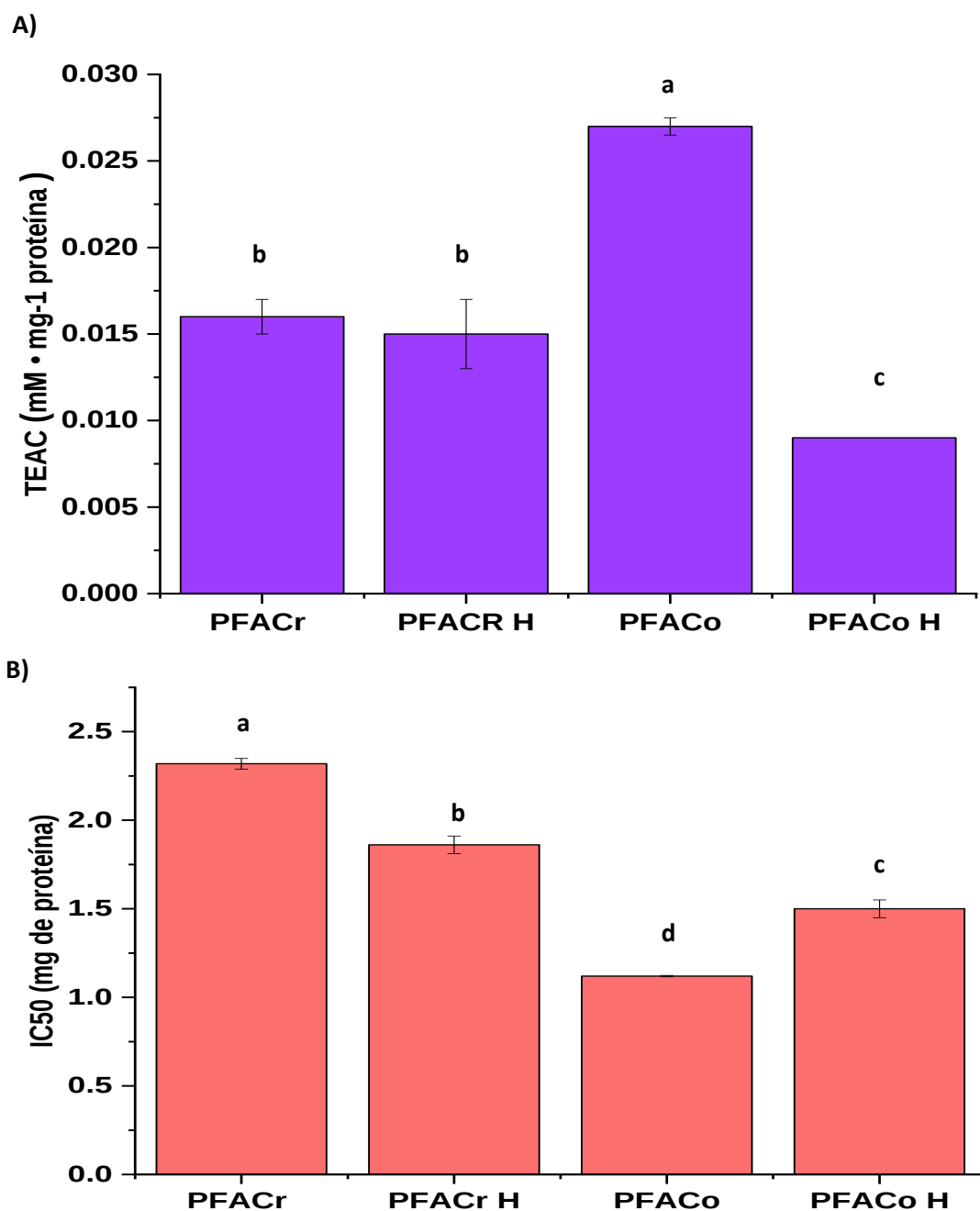


Figura 16. A) Captación del radical libre DPPH. B) Valores de IC₅₀ sobre el radical DPPH. PFACr: proteínas de frijol ayocote crudo. PFACr H: Proteínas hidrolizadas de frijol ayocote crudo. PFACo: Proteínas de frijol ayocote cocido. PFACo H: Proteínas hidrolizadas de frijol ayocote cocido.

Así mismo, aminoácidos como la lisina y arginina (aminoácidos básicos), los cuales se encuentran presentes en mayores cantidades en las proteínas de frijol ayocote, se han hallado de manera repetida en péptidos con actividad antioxidante (Lezama-García et al., 2018).

c) ABTS

Para el ensayo de decoloración del radical libre ABTS, se observaron valores de 0.308 ± 0.02 y 1.63 ± 0.00 mM eq TROLOX mg^{-1} proteína antes y después de la hidrólisis enzimática respectivamente (Figura 17 A), siendo menores a los reportados por Tovar-Benítez et al. (2020) (2.42 mM/mg de proteína) y Valdez-Ortiz et al. (2012) (1.903 – 3.778 mM/mg proteína) en proteínas hidrolizadas de *Phaseolus vulgaris*. Por otra parte, PFACo mostró un valor de 0.56 ± 0.00 y 1.95 ± 0.07 mM eq TROLOX mg^{-1} proteína, antes y después de la hidrólisis enzimática, esto es menor a lo obtenido por Betancur-Ancona et al. (2014) (6.4 mM/ mg proteína), en proteínas hidrolizadas de *Phaseolus vulgaris* cocido.

El IC_{50} para la muestra PFACr antes de hidrolizar fue de 0.84 ± 0.03 mg de proteína, y después de la hidrólisis enzimática se observó una disminución significativa ($p \leq 0.05$) a 0.020 ± 0.00 mg de proteína, lo cual indica que se requiere una concentración menor para inhibir el 50 % de la actividad del radical ABTS. En la muestra PFACo se observó un IC_{50} de 0.39 ± 0.00 mg de proteína y después de la hidrólisis enzimática hubo una disminución significativa ($p \leq 0.05$) a 0.006 ± 0.00 mg de proteína (Figura 17 B).

Los valores que se obtuvieron a través del radical ABTS fueron superiores a los del radical DPPH, esto coincide con lo reportado por Evangelho et al. (2017) y Valdez-Ortiz et al. (2012) quienes indican que ABTS es más sensible para determinar la capacidad antioxidante de las muestras a concentraciones más bajas de inhibidor, sin embargo, ambos radicales han sido los más utilizados por su excelente estabilidad en diferentes condiciones (Kuskoski et al., 2005), no existe un método que refleje de forma completa el perfil antioxidante de una

muestra, por lo que lo más acertado es la comparación de diferentes métodos para facilitar la interpretación de resultados (Sánchez-Mendoza et al., 2016).

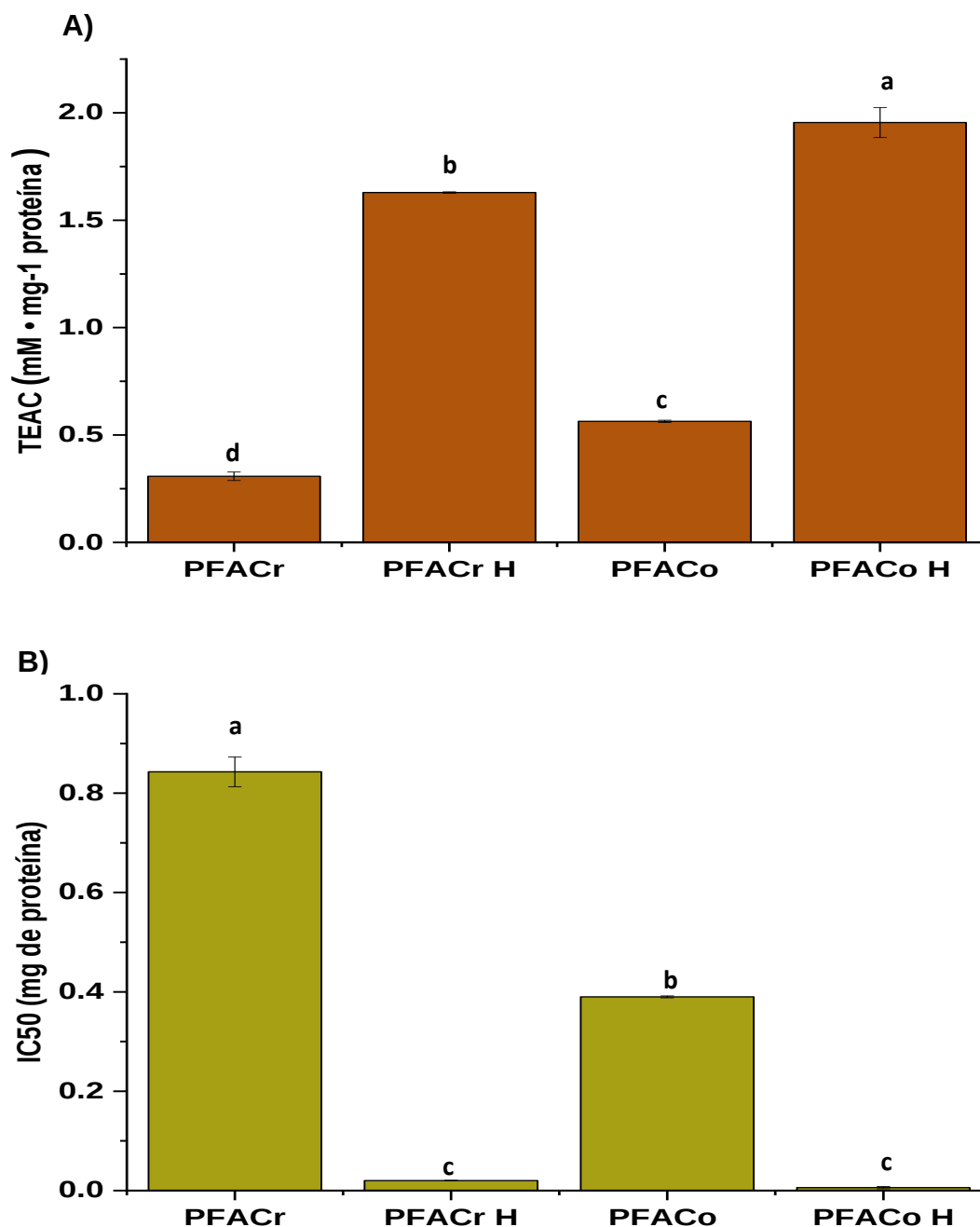


Figura 17. A) Captación del radical libre ABTS. B) Valores de IC₅₀ sobre el radical ABTS. PFACr: proteínas de frijol ayocote crudo. PFACr H: Proteínas hidrolizadas de frijol ayocote crudo. PFACo: Proteínas de frijol ayocote cocido. PFACo H: Proteínas hidrolizadas de frijol ayocote cocido.

Los posibles factores que podrían explicar la diferencia en ambos métodos son los siguientes: 1) las longitudes de onda utilizadas en cada método DPPH (515 nm) y ABTS (750 nm), habiendo a 515 nm una mayor interferencia de compuestos coloreados, por lo tanto, se mide mayor actividad antioxidante y 2) a los mecanismos de reacción del DPPH y los captadores de radicales libres, que también están influenciados por las conformaciones estructurales de los antioxidantes. Por lo tanto, las moléculas pequeñas que tienen un mejor acceso al sitio del radical tienen una mayor actividad antioxidante aparente con esta prueba (Beserra et al., 2011).

3.3.11 Actividad antihipertensiva

Los péptidos antihipertensivos son péptidos bioactivos que muestran actividad por la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I), la cual está relacionada con la regulación de la presión arterial por la modulación del sistema renina-angiotensina, dicha inhibición es de tipo competitivo debido a que los inhibidores se ligan a la enzima de misma manera que esta se liga al sustrato (Torruco-Uco et al., 2008).

Todas las muestras antes y después de la hidrólisis enzimática mostraron actividad sobre la ECA-I (Figura 18). La muestra PFACr y PFACo presentaron una actividad de $95.65 \pm 6.12 \%$ y $94.56 \pm 4.61 \%$ respectivamente, no se observó diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$), estos resultados fueron más altos que los reportado por Schisano et al. (2019) quienes presentan valores en un rango de 54 – 62 % en proteínas de *Phaseolus vulgaris*, mientras que Mune et al. (2018) y Li et al. (2006) reportaron que no hubo actividad en las proteínas aisladas de *Vigna subterranea* y *Vigna radiata*.

Después de la hidrólisis enzimática se observó una disminución en PFACr ($54.54 \pm 4.28 \%$) y en PFACo ($83.3 \pm 6.43 \%$), esta reducción pudo ser debido a la liberación de péptidos de aminoácidos con menor actividad inhibidora de la ECA-I (García-Mora et al., 2015), debido a que la bioactividad de los péptidos va a depender de su composición en aminoácidos y la posición que ocupen, péptidos

que poseen aminoácidos de fuerte hidrofobicidad en su C- y N- terminal, aminoácidos aromáticos que se encuentran en el C-terminal y aminoácidos con carga positiva tienen potentes actividades inhibitoras de la ECA-I (Ciau-Solís et al., 2017; Udeh et al., 2021).

Sin embargo, valores similares reportaron Boschín et al. (2014) en hidrolizados de proteínas de leguminosas como *Cicer arietinum* (86 %), *Lens culinaris* (79 %), *Lupinus angustifolius* (89 %), *Lupinus albus* (80 %), *Phaseolus vulgaris* (77 %), *Pisum sativum* (71 %) y *Glycine max* (88 %), mientras que Ciau-Solís et al. (2017) reportaron porcentaje de inhibición más bajo (10.53 %) en proteínas hidrolizadas de *Phaseolus lunatus* L.

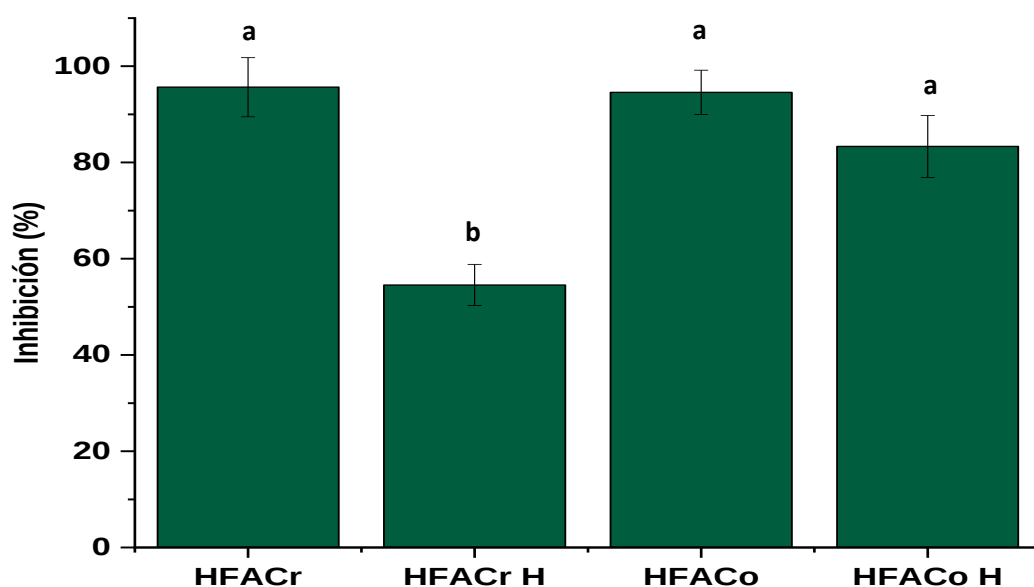


Figura 18. Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I. PFACr: proteínas de frijol ayocote crudo. PFACr H: Proteínas hidrolizadas de frijol ayocote crudo. PFACo: Proteínas de frijol ayocote cocido. PFACo H: Proteínas hidrolizadas de frijol ayocote cocido.

La diferencia en la actividad inhibitora de la ECA-I de las diferentes muestras comparadas puede ser debido a factores como la diferente estructura de las proteínas, el procedimiento para su extracción, así como la composición de la mezcla de péptidos que fue influenciada por el proceso de digestión (enzima, pH,

tiempo, temperatura, relación sustrato/enzima, entre otros) y el método utilizado para la determinación de la actividad inhibidora de la ECA (Boschin et al., 2014).

3.3.12 Conclusiones

Se obtuvo un rendimiento de harina en frijol ayocote crudo descorticado (HFACr) de 71.62 %, el cual fue significativamente mayor ($p \leq 0.05$) con respecto al obtenido a partir de frijol ayocote cocido descorticado (HFACo) de 55.78 %; cuyos contenidos de proteína fueron de $21.15 \pm 0.23 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ HFACr y $22.05 \pm 0.15 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ HFACo. Entre los aminoácidos esenciales, lisina y cisteína predominaron en ambas muestras.

La HFACr exhibió propiedades espumantes y emulsionantes, sin embargo, el tratamiento térmico (HFACo) mostró efecto negativo ($p \leq 0.05$) sobre estas propiedades tecno-funcionales.

Se aislaron proteínas de frijol ayocote crudo (PFACr) y cocido (PFACo) en un proceso de extracción alcalina a pH 12 y precipitación isoeléctrica a pH 4.4 (PFACr) y pH 4 (PFACo), con contenido proteico de $56.83 \pm 0.87 \%$ (PFACr) y $71.36 \pm 2.84 \%$ (PFACo).

La digestibilidad de PFACr fue de $85 \pm 0.22 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ y mejoró con el tratamiento térmico aplicado al frijol ayocote (PFACo) a $91 \pm 0.79 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

El tratamiento térmico del frijol ayocote permitió la mejora significativa ($p \leq 0.05$), de CE y la EE en PFACr a pH 3, mientras que la CEm de fue más afectada por la solubilidad, siendo mayor ($p \leq 0.05$) a pH 6.

La concentración mínima de gelificación para PFACr y PFACo fue de $12 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ dispersión, obteniéndose geles estructurados.

Las PFACr y PFACo y sus hidrolizados mostraron actividad antioxidante sobre los radicales DPPH y ABTS, encontrando mayor porcentaje de inhibición sobre el radical ABTS.

El contenido de CFT en las proteínas y sus hidrolizados pudieron haber contribuido en la actividad antioxidante, estos se encontraron en mayor concentración en PFACo.

Se encontró inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I) por parte de las proteínas y sus hidrolizados, mostrando mayor inhibición en las muestras sin hidrolizar.

Las proteínas del frijol ayocote muestran propiedades tecno-funcionales y bioactivas, las cuales al ser incorporadas en los alimentos pueden mejorar sus propiedades físicas y nutricionales.

3.3.13 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*. 22(6). 1256-1262. <https://doi.org/10.1021/jf60226a0420>
- Aguilera Gutiérrez, Y. (2009). Harinas de leguminosas deshidratadas: Caracterización nutricional y valoración de sus propiedades tecnológicas. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid Facultad de Ciencias Departamento de Química Agrícola.
- Akharume, F. U., Aluko, R. E., y Adedeji, A. A. (2021). Modification of plant proteins for improved functionality: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 198-224. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12688>
- Alcázar-Valle, M.; García-Morales, S.; Mojica, L.; Morales-Hernández, N.; Sánchez-Osorio, E.; Flores-López, L.; Enríquez-Vara, J.N.; Lugo-Cervantes, E. (2021). Nutritional, antinutritional compounds and nutraceutical significance of native bean species (*Phaseolus spp.*) of Mexican cultivars. *Agriculture*, 11(11), 1031. <https://doi.org/10.3390/agriculture11111031>
- Alfaro-Díaz, A., Urias-Sivas, J., Loarca-Piña, G., Gaytan-Martínez, M., Prado-Ramírez, R., y Mojica, L. (2020). Techno-functional properties of thermally treated black bean protein concentrate generated through ultrafiltration process. *LWT- Food Science and Technology*, 136, 110296. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110296>
- Alvarado-López, A. N., Gómez-Oliván, L. M., Heredia, J. B., Baeza-Jiménez, R., García-Galindo, H. S., & López-Martínez, L. X. (2019). Nutritional and bioactive characteristics of Ayocote bean (*Phaseolus coccineus* L.): An underutilized legume harvested in Mexico. *CyTA-Journal of Food*, 17(1), 199-206. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1571530>
- AOAC (2000) Official Methods of Analysis. 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, EUA. Methods 920.39, 954.01, 942.05.
- Aremu, M., Olaofe, O., & Orjioke, C.A. (2008). Chemical composition of bambara groundnut (*Vigna subterranea*), Kersting's groundnut (*Kerstingiella geocarpa*) and scarlet runner bean (*Phaseolus coccineus*) protein concentrates. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*. 85. 128-134
- Badui D., S. (2006). Química de los alimentos. 4ª Ed., editorial Pearson Educación, México. 103-105.
- Bedoya, R. A., & Maldonado, M. E. (2022). Características nutricionales y antioxidantes de la especie de frijol petaco (*Phaseolus coccineus*). *Revista Chilena de Nutrición*, 49(1), 34-42. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182022000100034>
- Bernardino-Nicanor, A., Acosta-García, G., Güemes-Vera, N., Montañez-Soto, J. L., de los Ángeles Vivar-Vera, M., & González-Cruz, L. (2017). Fourier transform infrared and Raman spectroscopic study of the effect of the thermal treatment and extraction methods on the characteristics of ayocote

- bean starches. *Journal of Food Science and Technology*, 54(4), 933–943. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2370-1>
- Beserra Almeida, M. M., Manchado de Sousa, P. H., Campos Arriaga, G. M. do P., de Carvalho Magalhães, C. E., Arraes Maia, G., & Gomes de Lemos, T. L. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 44(7), 2155–2159. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.051>
- Betancur-Ancona, D., Gallegos, S., y Chel, L. (2004). Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seed: partial characterization of starch and protein. *Journal of the Science of Food and Agricultura*. 84. 1193-1201. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1804>
- 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 & Technology*, 49(1), 2-8. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12267>
- Boschin, G., Scigliuolo, G. M., Resta, D., & Arnoldi, A. (2014). ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chemistry*, 145, 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.076>
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43(2), 414–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>
- Brosnan J.T., Brosnan M.E. (2013). Glutamate: A truly functional Amino acid. *Amino Acids*. 45:413–418. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1280-4>.
- Cano-Sarmiento, C., Téllez-Medina, D.I., Viveros-Contreras, R. et al. (2018). Zeta Potential of Food Matrices. *Food Engineering Review* 10, 113–138 <https://doi.org/10.1007/s12393-018-9176-z>
- Carović-Stanko, K., Maloić, M., Pintar, J., Liber, Z., Radosavljević, I., Bedeković, D. & Lazarević, B. (2018). Nutritional quality of phaseolin types and morphotypes of green bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agrociencia*, 52(4), 523-537.
- Castañeda-Pérez, E., Jiménez-Morales, K., Quintal-Novelo, C., Moo-Puc, R., Chel-Guerrero, L., y Betancur-Ancona, D. (2019). Enzymatic protein hydrolysates and ultrafiltered peptide fractions from Cowpea *Vigna unguiculata* L. bean with in vitro antidiabetic potential. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 16(8), 1773-1781. <https://doi.org/10.1007/s13738-019-01651-0>
- Chaparro, S. P., Tavera, M. L., Martínez, J. J., & Gil, J. H. (2014). Propiedades funcionales de la harina y de los aislados proteicos de la semilla de guanábana (*Annona muricata*). *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 17(1), 151-159.
- Ciau-Solís, N. A., Acevedo-Fernández, J. J., y Betancur-Ancona, D. (2017). In vitro renin-angiotensin system inhibition and in vivo antihypertensive activity of peptide fractions from lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Journal*

- of the Science of Food and Agriculture, 98(2), 781–786. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8543>
- Coffmann, C. W., & Garciaj, V. V. (1977). Functional properties and amino acid content of a protein isolate from mung bean flour. *International Journal of Food Science & Technology*, 12(5), 473–484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb00132.x>
- Cú-Cañetas, T., Betancur Ancona, D., Gallegos Tintoré, S., Sandoval Peraza, M., & Chel Guerrero, L. (2015). Estudios de inhibición in vitro de la enzima convertidora de angiotensina-I, efectos hipotensor y antihipertensivo de fracciones peptídicas de *V. unguiculata*. *Nutrición Hospitalaria*, 32(5), 2117-2125. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2015.32.5.9624>.
- Cruz-García Febe (2019) Propiedades funcionales de la froteína, fibra Y compuestos fenólicos del frijol ayocote (*Phaseolus Coccineus* L.) Tesis de Licenciatura. Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo.
- Cushman, D. W., y Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20(7), 1637-1648. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(71\)90292-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(71)90292-9)
- De Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2014). Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.11.012>
- Du, M., Xie, J., Gong, B., Xu, X., Tang, W., Li, X., ... & Xie, M. (2018). Extraction, physicochemical characteristics, and functional properties of Mung bean protein. *Food Hydrocolloids*, 76, 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.003>
- Espinosa-Ramírez, J., Mariscal-Moreno, R. M., Chuck-Hernández, C., Serna-Saldivar, S. O., & Espiricueta-Candelaria, R. S. (2022). Effects of the substitution of wheat flour with raw or germinated ayocote bean (*Phaseolus coccineus*) flour on the nutritional properties and quality of bread. *Journal of Food Science*, 87(9): 3766-3780.
- Estrada Fabián, L. L., Álvarez Velásquez, I., Acosta Chi, Z. A., Bravo-Delgado, C.H., y Altamirano-Fortoul, R. (2019). Desarrollo de un producto de panificación con harina no convencional como complemento para la alimentación infantil. *Academia Journals*, ISBN 978-1-939982-45-2, (4), 614-619.
- Evangelho, J. A. do, Vanier, N. L., Pinto, V. Z., Berrios, J. J. D., Dias, A. R. G., & Zavareze, E. da R. (2017). Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*, 214, 460–467.
- Fasolin LH, Cunha RL (2013) Characterization of soy extract processed under different drying methods and extraction conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(3):503–511
- Fennema R. Owen. (2000). Química de los alimentos. Segunda edición. España, Editorial Acribia

- Food and Agriculture Organization (FAO). (1985). Food and agriculture organization of the United States/World health organization/United Nations University, energy and protein requirements report of a joint FAO/WHO/UNU meeting. Geneva: World Health Organization.
- Gallegos Tintoré, S., Chel Guerrero, L., Corzo Ríos, L.J., Martínez Ayala, A.L. (2013). Péptidos con actividad antioxidante de proteínas vegetales. En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero & D. Betancur Ancona (Eds.), Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias (pp. 111-122). Barcelona: OmniaScience.
- García-Alanís, K., Baéz-González, J. B., Gallardo-Rivera, C. T., García-Solano, N. F., Walle-Castro, A. V., Martínez-García, M. K., y Hernández-Cortés, N. A. (2019). Caracterización fisicoquímica y efecto de la cocción en propiedades nutricionales del frijol *Vigna umbellata* Thumb. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. (4). 81-86.
- García, O., Aiello, C., Chirino, M. C. P., Ruíz-Ramírez, J., & Pons, I. A. (2012). Caracterización físico-química y propiedades funcionales de la harina obtenida de granos de quinchoncho (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) sometidos a diferentes procesamientos. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(4), 919-928.
- García Pacheco, Y., Cabrera Mercado, D., Ballestas Santos, J., Campo Arrieta, M. (2019). Efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre las propiedades tecfuncionales de la harina de fríjol blanco (*Phaseolus Lunatus* L.) y la determinación de su potencial uso agroalimentario, *INGE CUC*, 15 (2), 132–143. <http://doi.org/10.17981/ingecuc.15.2.2019.13>
- Gasca-Tuz, C., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2017). Capacidad antibacteriana de fracciones peptídicas de frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) obtenidas por hidrólisis enzimática. *Journal of Negative and No Positive Results: JONNPR*, 2(1), 8-16.
- Gómez-Maldonado, D., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., Leyva-Mir, S. G., Robles-Yerena, L., & Vernon-Carter, E. J. (2020). Antifungal activity of mango kernel polyphenols on mango fruit infected by anthracnose. *LWT- Food Science and Technology*, 126, 109337. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109337>
- Gomes-Almeida Sá, C.B.; Franco, M.Y.M.; Mattar, B.A.C. (2020) Food processing for the improvement of plant proteins digestibility. *Critical Review Food Science and Nutrition*, 60, 3367–3386
- Granito, M.; Guerra, M.; Torres, A., y Guinand, J. (2004). Efecto del procesamiento sobre las propiedades funcionales de *Vigna sinensis*. *Interciencia. Asociación Interciencia Caracas*. 29(9), 521-526.
- Granito, M., Guinand, J., Pérez, D., y Pérez, D. (2009). Valor nutricional y propiedades funcionales de *Phaseolus vulgaris* procesada: un ingrediente potencial para alimentos. *INCI*, 34 (1):64-70. ISSN 0378-1844.
- Gundogan, R., Can Karaca, A. (2020). Physicochemical and functional properties of proteins isolated from local beans of Turkey, *LWT - Food Science and Technology*, 130: 109609. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109609>
- Hojilla-Evangelista, M. P., Sutivisedsak, N., Evangelista, R. L., Cheng, H. N., & Biswas, A. (2018). Composition and functional properties of saline-soluble

- protein concentrates prepared from four common dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 95(8), 1001-1012. <https://doi.org/10.1002/aocs.12135>
- Jacinto-Hernández, C., Carrillo-Castañeda, G., & Campos-Escuerdo, A. (1996). Caracterización de cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) por sus cualidades físicas y nutricionales. I. Aspectos metodológicos. *Agronomy Mesoamerican*, 37-41.
- Jacinto-Hernández, C., Coria-Peña, M., Contreras-Santos, G., Martínez-López, L., Zapata-Martelo, E., & Ayala-Carrillo, Ma. del R. (2019). Azúcares totales y proteína en frijol nativo de la región Triqui Alta, Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(7), 1667-1674. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.2114>
- Ketnawa, S., Martínez-Alvarez, O., Benjakul, S., & Rawdkuen, S. (2016). Gelatin hydrolysates from farmed Giant catfish skin using alkaline proteases and its antioxidative function of simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chemistry*, 192, 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.087>
- Kumar, M., Tomar, M., Potkule, J., Punia, S., Dhakane-Lad, J., Singh, S. & Kennedy, J. F. (2022). Functional characterization of plant-based protein to determine its quality for food applications. *Food Hydrocolloids*, 123, 106986. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106986>
- Kusumah, S. H., Andoyo, R., & Rialita, T. (2020). Protein isolation techniques of beans using different methods: A review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 443, 012053. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/443/1/012053>
- Kuskoski, 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. *Food Science and Technology*, 25, 726-732. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- Lafarga, T., Álvarez, C., Bobo, G., y Aguiló-Aguayo, I. (2018). Characterization of functional properties of proteins from Ganxet beans (*Phaseolus vulgaris* L. var. Ganxet) isolated using an ultrasound-assisted methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 98: 106-112. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.033>
- Lezama-García, R., Chel-Guerrero, L., Acevedo-Fernández, J. J., & Betancur-Ancona, D. (2019). Efecto cicatrizante de fracciones peptídicas derivadas de la hidrólisis enzimática de proteínas de *Phaseolus lunatus*. *Nutrición Hospitalaria*, 36(1), 159-166. <https://dx.doi.org/10.20960/nh.1967>
- Li, W., Shu, C., Yan, S., & Shen, Q. (2010). Characteristics of sixteen mung bean cultivars and their protein isolates. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(6), 1205-1211. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02259.x>
- Li, G. H., Wan, J. Z., Le, G. W., & Shi, Y. H. (2006). Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from Alcalase hydrolysate of mung bean protein. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 12(8), 509-514. <https://doi.org/10.1002/psc.758>

- López Ibarra, C. (2018). Evaluación de las características nutricionales y funcionales del concentrado proteico de *Phaseolus acutifolius* Gray (Doctoral Dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- López-Monterrubio, D. I., Lobato-Calleros, C., Álvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2020). Huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.) protein: Composition, structure, physicochemical and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 108, 106043. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106043>
- Mariscal-Moreno, R. M., Chuck-Hernández, C., Figueroa-Cárdenas, J. D. D., & Serna-Saldivar, S. O. (2021). Physicochemical and nutritional evaluation of bread incorporated with ayocote bean (*Phaseolus coccineus*) and black bean (*Phaseolus vulgaris*). *Processes*, 9(10), 1782.
- Martínez-Velasco, A., Lobato-Calleros, C., Hernández-Rodríguez, B. E., Román-Guerrero, A., Álvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2018). High intensity ultrasound treatment of faba bean (*Vicia faba* L.) protein: Effect on surface properties, foaming ability and structural changes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 44, 97-105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.007>
- Mayoral, J. B., Moreno, A. C., & Martínez, E. S. M. (2014). Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. *Latin-American Journal of Physics Education*, 8(4), 19-21.
- Mengistu, T. M. (2017). Effect of processing on proximate and mineral composition of black climbing (*P. coccineus* L.) bean flour. *African Journal of Food Science*, 11(3), 74–81. <https://doi:10.5897/ajfs2016.1475>
- Mohan, N., & Mellem, J. J. (2020). Functional properties of the protein isolates of hyacinth bean [*Lablab purpureus* (L.) Sweet]: An effect of the used procedures. *LWT- Food Science and Technology* 129, 109572. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109572>
- Mojica, L., Chen, K., y de Mejía, E. G. (2014). Impact of commercial precooking of common bean (*Phaseolus vulgaris*) on the generation of peptides, after pepsin–pancreatin hydrolysis, capable to inhibit dipeptidyl peptidase-IV. *Journal of Food Science*, 80(1), H188-H198. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12726>
- Mosisa, M. T. (2017). Effect of processing on proximate and mineral composition of black climbing (*P. coccineus* L.) bean flour. *African Journal of Food Science*, 11, 74–81
- Mune, M. A. M., Minka, S. R., & Henle, T. (2018). Investigation on antioxidant, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity of Bambara bean protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 250, 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.001>
- Muñoz-Velázquez, E. E., Rubio-Hernández, D., Bernal-Lugo, I., Garza-García, R., & Jacinto-Hernández, C. (2009). Characterization of native bean genotypes from the state of Hidalgo, based on its grain quality. *Agricultura Técnica en México*, 35(4), 429-438.
- Navarro, S. L., & Larios López, X. J. (2019). Evaluación de sustitución parcial de harina de trigo por harina de frijol *Phaseolus vulgaris* en la formulación de

- tortas. *Revista Ciencia Y Tecnología El Higo*, 9(1), 35–44. <https://doi.org/10.5377/elhigo.v9i1.8995>
- Vegas, R., Zavaleta, A., & Vegas, C. (2017). Efecto del pH y cloruro de sodio sobre las propiedades funcionales de harina de semillas de *lupinus mutabilis* “tarwi” variedad criolla. *Agroindustrial Science*, 7(1), 49-55. <https://doi.org/10.17268/agroind.science.2017.01.05>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2016). Legumbres. Semillas nutritivas para un futuro sostenible. <https://www.fao.org/3/i5528s/i5528s.pdf>
- Paucar-Menacho, L. M., Dueñas, M., Peñas, E., Frías, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2018). Effect of dry heat puffing on nutritional composition, fatty acid, amino acid and phenolic profiles of pseudocereals grains. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 68(4). <https://doi.org/10.1515/pjfn-2018-0005>
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2), 346-356. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4)
- Polanco-Lugo, E., Dávila-Ortiz, G., Betancur-Ancona, D. A., & Chel-Guerrero, L. A. (2014). Effects of sequential enzymatic hydrolysis on structural, bioactive and functional properties of *Phaseolus lunatus* protein isolate. *Food Science and Technology*, 34(3), 441-448. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.6349>
- Porras-Godínez, M. R., Pedroza-Islas, R., Franco-Rodríguez, G., & Martín-Martínez, S. (2015). Efecto del tratamiento térmico en la humectación de películas comestibles de proteína aislada de suero de leche y goma de mezquite (*Prosopis spp.*). *Agrociencia*, 49(1), 1-13.
- Quiroz-Sodi, M., Mendoza-Díaz, S., Hernández-Sandoval, L., & Carrillo-Ángeles, I. (2018). Characterization of the secondary metabolites in the seeds of nine native bean varieties (*Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*) from Querétaro, Mexico. *Botanical Sciences*, 96(4), 650-661. <https://doi.org/10.17129/botsci.1930>
- Ramírez, A., & Pacheco de Delahaye, E. (2009). Propiedades funcionales de harinas altas en fibra dietética obtenidas de piña, guayaba y guanábana. *Interciencia*, 34(4), 293-298. Recuperado en 30 de abril de 2022, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037818442009000400014&lng=es&tlng=es.
- Ramírez-Jiménez, A. K., Reynoso-Camacho, R., Mendoza-Díaz, S., & Loarca-Piña, G. (2014). Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours. *Food Chemistry*, 161, 254-260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.008>
- Raya-Pérez, J. C., Gutiérrez-Benicio, G. M., Ramírez Pimentel, J. G., Covarrubias-Prieto, J., & Aguirre-Mancilla, C. L. (2014). Caracterización de proteínas y contenido de mineral de dos variedades de frijol de México. *Agronomía Mesoamericana*. 25(1). ISSN:2215-3608. 1-11
- Renkema, J. M. S. (2001). Formation, structure and rheological properties of soy protein gels. Wageningen University. The Netherlands.

- Rochín-Medina, J. J., Mora-Rochín, S., Navarro-Cortez, R. O., Tovar-Jimenez, X., Quiñones-Reyes, G., Ayala-Luján, J. L., y Aguayo-Rojas, J. (2021). Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de variedades de frijol sembradas en el estado de Zacatecas. *Acta Universitaria*, 31, e3059. <https://doi.org/10.15174/au.2021.3059>
- Rodríguez-Salinas, P. A., Urías-Orona, V., Muy-Rangel, D., Basilio-Heredia, J., Suarez-Jacobo, A., Báez-González, J. G., Zavala-García, F., & Niño-Medina, G. (2021). Efecto de termosonicación y pasteurización sobre propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y nutraceuticas en bebidas de maíz. *Biotecnia*, 23(1), 92-101. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i1.1204>
- Roy, M., Sarker, A., Azad, M. A. K., Shaheb, M. R., & Hoque, M. M. (2020). Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of dark red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) protein hydrolysates. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(1), 303-313. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00292-4>
- Sánchez-Mendoza, N.A., Cruz-Castellanos, M., Dávila-Ortiz, G., & Jiménez-Martínez, C. (2016). Péptidos con actividad antioxidante provenientes de fuentes animales y vegetales. En M.E. Ramírez Ortiz (Ed.). *Alimentos Funcionales de Hoy*. Barcelona, España: OmniaScience. 117-142.
- Sangronis, E., Machado, C., & Cava, R. (2004). Propiedades funcionales de las harinas de leguminosas (*Phaseolus vulgaris* y *Cajan cajan*) germinadas. *Interciencia*, 29(2), 80-85. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037818442004000200007
- Schisano, C., Narciso, V., Maisto, M., Annunziata, G., Grieco, P., Sommella, E. M., Tenore, C. G., & Novelillo, E. (2019). In vitro effects of protein fractions from controne beans (*Phaseolus vulgaris* L. ecotype Controne) on intestinal permeability, ACE and α -amylase activities. *European Food Research and Technology*, 245, 2311–2322. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03338-5>
- Siddiq, M., Ravi, R., Harte, J. B., y Dolan, K. D. (2010). Physical and functional characteristics of selected dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. *LWT - Food Science and Technology*, 43(2), 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.07.009>
- Shevkani, K., Kaur, R., Singh, N., & Hlanze, D. P. (2022). Colour, composition, digestibility, functionality and pasting properties of diverse kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) flours. *Current Research in Food Science*, 5, 619-628.
- Tang, C. H., & Ma, C. Y. (2009). Heat-induced modifications in the functional and structural properties of vicilin-rich protein isolate from kidney (*Phaseolus vulgaris* L.) bean. *Food Chemistry*, 115(3), 859-866. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.104>
- Tang, C. H., Sun, X., & Yin, S. W. (2009). Physicochemical, functional and structural properties of vicilin-rich protein isolates from three *Phaseolus* legumes: Effect of heat treatment. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1771-1778. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.03.008>

- Tan, E. S., Ying-Yuan, N., & Gan, C. Y. (2014). A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimization. *Food Chemistry*, 152, 447-455. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.008>
- Teniente-Martínez G., González C.L., Cariño-Cortés R., y Bernardino-Nicanor A. (2016). Caracterización de las proteínas del frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1(1), 1-6.
- Teniente-Martínez, G., González-Cruz, L., Hernández-Galván, A.N., Juárez-Goiz, J.M.S., Bernardino-Nicanor, A. (2019). Propiedades funcionales del aislado proteínico de dos variedades de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, (4), 48-55.
- Torres, J., Rutherford, S. M., Muñoz, L. S., Peters, M., & Montoya, C. A. (2016). The impact of heating and soaking on the in vitro enzymatic hydrolysis of protein varies in different species of tropical legumes. *Food Chemistry*, 194, 377-382. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.022>
- Torruco-Uco, J. G., Domínguez-Magaña, M. A., Dávila-Ortíz, G., Martínez-Ayala, A., Chel-Guerrero, L. A., y Betancur-Ancona, D. A. (2008). Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(2), 158–168. <https://doi.org/10.1080/11358120809487641>
- Tovar-Benítez, T., Vega-Zuñiga, K. A., Porras-Saavedra J. y Pérez-Pérez N. C. (2020). Evaluación de la actividad antioxidante de hidrolizados proteicos obtenidos de semillas de frijol bayo cultivadas en el valle del mezquital. *Revista de ingeniería y tecnología para el desarrollo sustentable (REINGTEC)*, (8), 22-25
- Udeh, C., Ifie, I., Akpodiete, J., & Malomo, S. (2021). Kidney bean protein products as potential antioxidative and antihypertensive alternatives for non-pharmacological inhibition of angiotensin-converting enzymes. *Scientific African*, 11, e00693. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00693>
- Valdez-Ortiz, A., Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J., Gutiérrez-Dorado, R., y 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>
- Vargas-Vázquez, Ma. L. P., Muruaga Martínez, J. S., Martínez-Villa Real, S. E., Ruiz-Salazar, R., Hernández-Delgado, S., y Mayec-Pérez, N. (2011). Diversidad morfológica del frijol ayocote del Carso Huasteco de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 88. 767-775.
- Vázquez-Mendoza M. (2021). Análisis de las propiedades fisicoquímicas de tostadas de maíz y frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*) (Doctoral dissertation, Universidad Politécnica De Francisco I. Madero). México
- Vegas, R., Zavaleta, A., & Vegas, C. (2017). Efecto del pH y cloruro de sodio sobre las propiedades funcionales de harina de semillas de *Lupinus*

- mutabilis* “tarwi” variedad criolla. *Agroindustrial Science*, 7(1), 49-55. <https://doi.org/10.17268/agroind.science.2017.01.05>
- Velasco-González, O., San Martín-Martínez, E., Aguilar-Méndez, M., Pajarito-Ravelero, A., y Mora-Escobedo, R. (2013). Propiedades físicas y químicas del grano de diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bioagro*, 25(3), 161-166. Recuperado en 04 de mayo de 2022, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S131633612013000300002&lng=es&tlng=es.
- Wani, I. A., Sogi, D. S., Shivhare, U. S., y Gill, B. S. (2015). Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates. *Food Research International*, 76, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.027>
- Wijatniko, B. D., & Murdiati, A. (2019, April). Antioxidant activity of bioactive peptides derived from the hydrolysates of jack bean (*Canavalia ensiformis* (L.) DC.) protein isolate. In *AIP Conference Proceedings*, 2099 (1), 020028. AIP Publishing LLC. <https://doi.org/10.1063/1.5098433>
- Zhang, F., Jiang, S., Feng, X., Wang, R., Zeng, M., & Zhao, Y. (2020). Physicochemical state and in vitro digestibility of heat-treated water-soluble protein from Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Food Bioscience*, 34, 100528. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100528>