



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**  
**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**

**CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIHIPERTENSIVA DE  
BIOPÉPTIDOS DE LEGUMINOSAS SOMETIDOS A UNA DIGESTIÓN  
GASTROINTESTINAL SIMULADA**

Que como requisito parcial  
para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**

Presenta

**GUILLERMO ISMAEL KOH KANTÚN**



COMISIÓN GENERAL ACADÉMICA  
CENTRO DE SERVICIOS ESCOLARES  
DIRECCIÓN DE EDUCACIONES PROFESIONALES

Bajo la supervisión de: **CONSUELO SILVIA OLIVIA  
LOBATO CALLEROS, Dra.**



Chapingo, Estado de México, diciembre de 2016

**CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIHIPERTENSIVA DE  
BIOPÉPTIDOS DE LEGUMINOSAS SOMETIDOS A UNA DIGESTIÓN  
GASTROINTESTINAL SIMULADA**

Tesis realizada por **Guillermo Ismael Koh Kantún** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**

Directora



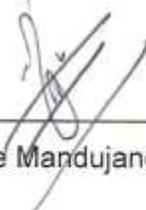
\_\_\_\_\_  
Dra. Consuelo S.O. Lobato Calleros

Co-directora



\_\_\_\_\_  
Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez

Asesor



\_\_\_\_\_  
Dr. Eleazar Aguirre Mandujano

Asesora



\_\_\_\_\_  
Dra. Landy Hernández Rodríguez

## *Dedicatoria*

*A mi padre Rey David Koh Quintal, por ser siempre una inspiración y base de mis fortalezas.*

*A mi madre Nidelvia del Socorro Kantún Dzib, por todo su amor y paciencia.*

*A mis hermanos Ángel, Carlos y Jesús, por recordarme lo importante que es enseñar con el ejemplo.*

*Con mucho cariño:*

*Memo*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado para el desarrollo de mis estudios de posgrado.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) por el apoyo económico otorgado para este trabajo de investigación en la etapa final.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria por todas las facilidades otorgadas, por ampliar mis horizontes, conocimientos y habilidades.

A la Dra. Carmen Ybarra Moncada por todos sus consejos, enseñanzas e interesantes conversaciones. Gracias por todo su apoyo y por creer en mí.

A la Dra. Blanca Hernández Rodríguez por toda su ayuda, paciencia, tiempo, y dedicación que me dedicó en la realización de esta tesis, sin usted no sería posible. Gracias por compartir su conocimiento y experiencia, por corregirme y saber motivarme.

A la Dra. Consuelo Lobato Calleros por aceptarme como su tesista, por la confianza brindada, por abrirme las puertas a su gran equipo de trabajo y por todo el apoyo brindado para esta tesis.

Al Dr. Eleazar Aguilar Mandujano le agradezco todo su tiempo, apoyo logístico y material para la realización de este trabajo.

A la Dra. Landy Hernández Rodríguez apoyo y por su contribución en la mejora del trabajo final.

A la Señora Esperanza Salinas Banda por siempre apoyarme en todo lo necesario y por su amistad.

A Miriam Quintana Moreno, por su apoyo en la parte experimental de este trabajo.

A Memo Pérez Esteban por ser un verdadero amigo, de principio a fin, gracias por las tardes de café escuchando a Silvio Rodríguez, por nuestras largas pláticas y por todo tu apoyo brindado este tiempo, gracias amigo Memo.

A Anallely López Yerena por tu gran amistad, tu hospitalidad y por todo lo que vivimos hasta el último día.

A Diana López Monterrubio por ser una gran amiga, por nuestras pláticas y por todos esos gratos momentos.

A Adela Rosas Rosas por los buenos momentos que compartimos.

Y a todos los profesores y compañeros que contribuyeron con mi crecimiento profesional.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE CUADROS .....	ix
ABREVIATURAS .....	ix
DATOS BIOGRÁFICOS.....	x
RESUMEN GENERAL.....	11
GENERAL ABSTRACT.....	12
1 INTRODUCCIÓN .....	13
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1 Los péptidos .....	16
2.2 Fuentes de proteína vegetal .....	18
2.3 Hidrólisis de proteínas .....	19
2.4 Digestión gastrointestinal simulada .....	21
2.5 Distribución de pesos moleculares .....	22
2.6 Actividad antioxidante.....	23
2.7 Actividad antihipertensiva .....	26
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1 Materiales .....	30
3.1.1 Material vegetal .....	30
3.1.2 Enzimas .....	30
3.1.3 Reactivos .....	30
3.1.4 Equipos.....	30
3.1.5 Diseño estadístico .....	31
3.2 Métodos.....	31
3.2.1 Obtención de hidrolizados .....	31
3.2.2 Obtención de aislados de proteína .....	31

3.2.3 Cuantificación de proteína .....	32
3.2.4 Digestión gastrointestinal simulada .....	32
3.2.5 Distribución de pesos moleculares .....	33
3.2.6 Grado de hidrólisis .....	33
3.2.7 Actividad antioxidante .....	34
3.2.7 Actividad antihipertensiva .....	35
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
4.1 Grado de hidrólisis .....	36
4.2 Distribución de pesos moleculares .....	38
4.3 Actividad antioxidante .....	45
4.4 Actividad antihipertensiva .....	48
5 CONCLUSIONES .....	53
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55
7 ANEXOS .....	63

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Obtención de biopéptidos.....	19
Figura 2. Efecto de la digestión gastrointestinal simulada sobre el grado de hidrólisis (%) de hidrolizados y aislados de proteína. ....	36
Figura 3. Distribución de pesos moleculares del hidrolizado de proteína de alberjón obtenido con Flavourzyme <sup>®</sup> , a diferentes tiempos de digestión gastrointestinal simulada. ....	38
Figura 4. Distribución de pesos moleculares del hidrolizado de proteína de alberjón obtenido por fermentación en medio sólido, a diferentes tiempos de digestión gastrointestinal simulada.....	39
Figura 5. Distribución de pesos moleculares del hidrolizado de proteína de haba obtenido con Flavourzyme <sup>®</sup> , a diferentes tiempos de digestión gastrointestinal simulada.....	40
Figura 6. Distribución de pesos moleculares del hidrolizado de proteína de haba obtenido por fermentación en medio sólido, a diferentes tiempos de digestión gastrointestinal simulada.....	41
Figura 7. Distribución de pesos moleculares del aislado de proteína de alberjón, a diferentes tiempos de digestión gastrointestinal simulada. ....	42
Figura 8. Distribución de pesos moleculares del aislado de proteína de haba, a diferentes tiempos de digestión gastrointestinal simulada....	43

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Efecto de la digestión gastrointestinal simulada sobre la actividad antioxidante de hidrolizados y aislados de proteína. .... 45

Cuadro 2. Efecto de la digestión gastrointestinal simulada sobre la actividad antihipertensiva de hidrolizados y aislados de proteína. .... 48

## ABREVIATURAS

AE	Hidrolizado de proteínas de alberjón por Flavourzyme® 1000 L
AF	Hidrolizado de proteínas de alberjón por fermentación en medio sólido
HE	Hidrolizado de proteínas de haba por Flavourzyme® 1000 L
HF	Hidrolizado de proteínas de haba por fermentación en medio sólido
APA	Aislado de proteína de alberjón
APH	Aislado de proteína de haba
DGIS	Digestión gastrointestinal simulada
GH	Grado de hidrólisis
DPM	Distribución de pesos moleculares
ECA-I	Enzima convertidora de angiotensina I
DPPH	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

### **Datos personales**

Nombre: Guillermo Ismael Koh Kantún

Fecha de nacimiento: 16 de abril de 1990

Lugar de nacimiento: Maxcanú, Yucatán

No. Cartilla Militar: 0073447

CURP: KOKG900416HYNHNL02

Profesión: Ingeniero Agroindustrial

Cédula Profesional: 08721551

### **Desarrollo académico**

Bachillerato: Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo. México

Licenciatura: Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo. México.

# CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIHIPERTENSIVA DE BIOPÉPTIDOS DE LEGUMINOSAS SOMETIDOS A UNA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA

## RESUMEN GENERAL

Los péptidos de leguminosas presentan diversas actividades biológicas. Estas moléculas representan un ingrediente potencial para la formulación de alimentos funcionales. Sin embargo, es necesario analizar el efecto de las condiciones gastrointestinales sobre las actividades biológicas. Hidrolizados de proteína de alberjón (*Lupinus gredensis*) y haba (*Vicia faba*) producidos con Flavourzyme® 1000 L y por fermentación en medio sólido (*Aspergillus niger* GH1) fueron sometidos a condiciones de digestión gastrointestinal simulada con pepsina (4 % p/p, pH 2, 37 °C, 2 h) y pancreatina (10 % p/p, pH 7.5, 37 °C, 2 h). Alícuotas a las 0, 2 y 4 h fueron empleadas para realizar todas las determinaciones. La digestión no tuvo efecto sobre el grado de hidrólisis del hidrolizado de alberjón obtenido por fermentación. En los demás hidrolizados y aislados de proteína, el grado de hidrólisis aumentó después de la digestión. Durante la digestión el perfil de pesos moleculares varió de 50 a 10 kDa en los hidrolizados. Los aislados de proteína, presentaron una distribución de pesos más amplia, desde 10 hasta 250 kDa lo que indica que la hidrólisis fue menos efectiva en estos hidrolizados. Los aislados de proteína sólo presentaron actividad antioxidante al término de la digestión. La digestión simulada sólo afectó al hidrolizado de alberjón obtenido por fermentación, reduciendo su poder antioxidante al final de la digestión. Hidrolizados de haba sólo presentaron actividad antihipertensiva después de la digestión (IC<sub>50</sub> de 8.66 y 8.93 mg/mL respectivamente). Los aislados de proteína no presentaron actividad antihipertensiva. En conclusión, los hidrolizados de haba, y el hidrolizado de alberjón enzimático de alberjón mantienen su actividad antioxidante y antihipertensiva después de la digestión. Para mantener la actividad antioxidante del hidrolizado de alberjón obtenido por fermentación, se sugiere incorporarlo a un sistema de protección y liberación controlada.

**Palabras clave:** Alberjón, haba, SDS-PAGE, grado de hidrólisis, DPPH, Inhibición ECA-I.

# CHANGES IN THE ANTIOXIDANT AND ANTIHYPERTENSIVE ACTIVITY OF LEGUME BIOPEPTIDES SUBJECT TO A SIMULATED GASTROINTESTINAL DIGESTION

## GENERAL ABSTRACT

Legume peptides exhibit different biological activities. These molecules represent a potential ingredient for the formulation of functional foods. However, it is necessary to analyze the effect of gastrointestinal conditions on the biological activities. Lupin (*Lupinus gredensis*) and bean (*Vicia faba*) protein hydrolysates produced with Flavourzyme<sup>®</sup> 1000 L and by fermentation in solid medium (*Aspergillus niger* GH1) were subjected to simulated gastrointestinal digestion conditions with pepsin (4% w/w, pH 2, 37 °C, 2 h) and pancreatin (10 % w/w, pH 7.5, 37 ° C, 2 h). Aliquots at 0, 2 and 4 h were used to perform all determinations. The digestion had no effect on the degree of hydrolysis of the lupin hydrolyzate obtained by fermentation. In the other hydrolysates and protein isolates, the degree of hydrolysis increased after digestion. During digestion, the molecular weight distribution ranged from 50 to 10 kDa in all the hydrolysates. Protein isolates had a broader weight distribution, from 10 to 250 kDa indicating that the hydrolysis was less effective in these hydrolysates. Protein isolates showed antioxidant activity only at the end of digestion. The simulated digestion only affected the lupin hydrolyzate obtained by fermentation, reducing its antioxidant power at the end of the digestion. Bean hydrolysates showed activity antihypertensive only at the end of digestion (IC<sub>50</sub> values of 8.66 and 8.93 mg/mL, respectively). Protein isolates did not show antihypertensive activity. In conclusion, the bean hydrolysates, and the lupin hydrolyzate by Flavourzyme, maintain their antioxidant and antihypertensive activity after digestion. To maintain the antioxidant activity of the lupin hydrolyzate obtained by fermentation, it is suggested to incorporate it into a controlled release and protection system.

**Key words:** Lupin, bean, SDS-PAGE, hydrolysis degree, DPPH, ECA-I, inhibition.

## 1 INTRODUCCIÓN

Las leguminosas son uno de los componentes más importantes en una dieta balanceada y saludable. Su consumo se relaciona con una disminución en la ocurrencia de enfermedades crónicas. Se ha reportado que los péptidos derivados de diversas proteínas de leguminosas han mostrado diferentes tipos de actividades biológicas favorables *in vitro*, tales como: antimicrobiana, antihipertensiva, antioxidantes y antitrombóticas, así como una mejora de la absorción de minerales (Malaguti *et al.*, 2015).

Diversos péptidos bioactivos se encuentran en alimentos de origen vegetal, pero en la mayoría de los casos, estos se encuentran en un estado latente como parte de la secuencia de una proteína y deben ser liberados. Entre los mecanismos desarrollados, el más usual es la hidrólisis enzimática, empleando proteasas de origen animal, vegetal y microbiano (García, Puchalska, Esteve & Marina, 2013).

Entre estas actividades favorables se encuentra la actividad antioxidante, la cual contrarresta los efectos de los radicales libres. Los radicales libres son generados en el cuerpo bajo condiciones normales durante la respiración en organismos aeróbicos, particularmente los vertebrados, y pueden ejercer un papel preventivo contra infecciones. Sin embargo, un desbalance en los radicales reactivos puede ocasionar daño celular, el cual puede derivar en enfermedades como aterosclerosis, diabetes y cáncer (Luna *et al.*, 2015).

El consumo de proteínas, péptidos y aminoácidos puede contribuir a la defensa antioxidante en el cuerpo (Luna *et al.*, 2015). Recientemente se evidenció la actividad antioxidante en péptidos de garbanzo, atribuyéndola a la presencia de

histidina, triptófano y fenilalanina, en los que el grupo fenólico podría servir como donador de hidrógeno (Torres, Contreras, Recio, Alaiz & Vioque, 2015).

Adicionalmente, Capriotti, Caruso, Cavaliere, Samperi, Ventura, Zenezini & Lagana (2015) sometieron proteínas de soya a una digestión gastrointestinal simulada y reportaron la generación de gran número de péptidos, algunos de los cuales presentaron actividades: Antioxidante, antihipertensiva y antimicrobiana.

Otra actividad relevante de los péptidos es la antihipertensiva. En esta, la enzima convertidora de angiotensina (ECA-I) juega un papel importante ya que participa en la regulación de la sangre al promover la conversión de la angiotensina I a un potente vasoconstrictor, la angiotensina II, al mismo tiempo que inactiva al vasodilatador bradikinina. Debido a esto, inhibidores sintéticos de este proceso han sido usados como agentes antihipertensivos. En años recientes algunas proteínas de alimentos han sido identificadas como fuentes de péptidos inhibidores de la ECA-I. (Erdmann, Cheung & Schröder, 2008).

El principio de la prueba de evaluación antihipertensiva se basa en la reacción de la enzima con el sustrato, en la que uno de los productos es el ácido hipúrico. Pero si antes de que la enzima actúe sobre el sustrato, ésta se encuentra en presencia de péptidos con poder inhibitorio ECA-I, entonces no habrá formación de ácido hipúrico, ya que los péptidos habrán ocupado los sitios activos de la enzima. La detección de ácido hipúrico permite saber si un agente biológico cuenta con actividad inhibitoria ECA-I (Erdmann *et al.*, 2008).

A pesar de que los biopéptidos pueden ejercer alguna actividad favorable en el organismo, ésta puede variar debido a que durante la digestión gastrointestinal son sometidos a la acción de enzimas proteolíticas y cambios de pH debidos a los jugos gástricos. Los péptidos con largas secuencias de aminoácidos o hidrolizados que aún son susceptibles a las enzimas digestivas, requieren ser incorporados en sistemas de liberación controlada, tales como micro y nano

cápsulas, liposomas o complejos coacervados, entre otros (Luna, Mojica, Gonzáles de Mejía, Mendoza & Loarca, 2015).

El presente trabajo tiene como objetivo determinar el efecto de la digestión gastrointestinal simulada sobre el grado de hidrólisis, la distribución de pesos moleculares, las actividades antioxidante y antihipertensiva de hidrolizados de alberjón, haba y sus respectivos aislados de proteína.

## 2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Péptidos

Los péptidos son un tipo de moléculas formadas por la unión de varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos. Numerosos péptidos son encontrados usualmente en el tracto gastrointestinal, algunos derivan de la digestión de proteínas de alimentos y otras son liberadas por células del intestino. A los péptidos derivados de alimentos y que tienen funciones biológicas, se les llama biopéptidos y han sido definidos como fragmentos de proteínas que tienen un impacto positivo sobre las funciones del cuerpo y finalmente una influencia sobre la salud. Algunas de estas funciones pueden actuar en los sistemas cardiovascular, digestivo, inmune y nervioso (Boutrou, Gwénaële & Sánchez, 2015).

Los péptidos pueden existir naturalmente o derivarse de secuencias crípticas de proteínas nativas. Se liberan principalmente a través de la hidrólisis por enzimas digestivas, microbianas y de origen tanto animal como vegetal (Coda, Rizzello, Pinto & Gobetti, 2012). Los péptidos bioactivos tienen diferentes efectos biológicos sobre la salud humana, tales como propiedades inhibitorias de la hipertensión arterial (ECA-I), capacidad reductora del colesterol, actividades antitrombóticas y antioxidantes, aumento de la absorción / biodisponibilidad de minerales y actividades pseudo opiáceas (Zambrowicz, Timmer Polanowski, Lubec & Trziszka, 2013). Un péptido puede poseer más de una función biológica, teniendo en cuenta que la actividad biológica de los péptidos puede tener un efecto positivo o negativo en el organismo. Los péptidos celíacos son un ejemplo de péptidos con una influencia negativa en el organismo (Meisel, 1998; Kitts & Weiler, 2003).

El tamaño de los péptidos es muy variado, conteniendo en promedio de 2 a 20 residuos de aminoácidos (Pihlanto, 2001). Se han identificado tanto di o tri péptidos así como polipéptidos complejos lineales o cíclicos, los cuales frecuentemente están modificados por glicosilación, fosforilación o acilación de los residuos de aminoácidos (Dziuba & Darewicz, 2007). También se han encontrado secuencias sobrepuestas de péptidos con diferentes funciones formando parte de la estructura de ciertas proteínas, como las caseínas (Meisel, 1998).

Los biopéptidos son fuentes convenientes de proteína para la nutrición humana porque son absorbidos más eficientemente a través del tracto gastrointestinal en comparación con las proteínas intactas (Lisboa, Pereira, Ferreira & Jorge, 2014). Estos pueden ejercer su acción tanto a nivel local (a través de la interacción con receptores en las células del tracto gastrointestinal) como sistémico, ya que pueden atravesar el epitelio intestinal. Los péptidos más pequeños (dos o tres residuos de aminoácidos) pueden ser absorbidos más fácilmente en comparación a los más grandes. Los péptidos más largos, como los péptidos antimicrobianos, ejercen su actividad localmente en el tracto intestinal. (Meisel, 2004; Vermeirssen, Van Camp & Verstraete, 2004)

Como ejemplo representativo, la proteína de la leche es una fuente rica de biopéptidos tales como antihipertensivos (inhibidores ECA-I), opioides, inmunoestimulantes, antimicrobiano y reductores del colesterol (Meisel, 1997). Las  $\beta$ -casomorfina son una secuencia particular de péptidos en la que la  $\beta$ -CN ha sido más estudiada que otro péptido bioactivo (Park, Gibbs & Lee, 1996). Residuos N-terminales de Tirosina encontrados en todas las  $\beta$ -casomorfina son críticos para su actividad antihipertensiva (Schlimme, Meisel & Frister, 1988). Debido al alto contenido de residuos prolina, estos péptidos son aparentemente resistentes al ataque proteolítico (Kreil, Umbach, Bramntl, & Teschemacher, 1983). El alberjón (*Lupinus gredensis*) contiene 20.1 g/kg de prolina (Pastor, Juan, Pastor, Alaiz & Vioque 2009).

## 2.2 Fuentes de proteína vegetal

Algunas proteínas y péptidos bioactivos se encuentran naturalmente en los alimentos vegetales, pero en la mayoría de los casos, los péptidos bioactivos están en estado latente como parte de la secuencia de una proteína y tienen que ser liberados para ejercer su actividad biológica. Entre los alimentos vegetales, la soya ha sido la más explorada, probablemente debido a su alto contenido en proteínas, sus conocidos beneficios para la salud y su extenso uso en todo el mundo (García *et al.*, 2013).

Las semillas de leguminosas tienen un mayor contenido de proteínas nutricionales (200 - 400 g/kg) que otras semillas, como los cereales (70 - 140 g/kg) (Chel, Pérez, Betancur & Dávila, 2002). El alto contenido proteico de los aislados o concentrados de proteínas de leguminosas los está haciendo cada vez más importantes en la industria alimentaria, donde representan un ingrediente alternativo prometedor para preparar y desarrollar nuevos alimentos (Lecomte, Zayas & Kastner, 1993).

Un ejemplo de lo anterior son las habas de lima (*Phaseolus lunatus*), que se cultivan en regiones tropicales como México. Sus semillas tienen un contenido elevado de proteínas (210 - 260 g/kg) y alto contenido en carbohidratos (550 - 640 g/kg), son bajas en grasa (10 - 23 g/kg) y fibra (32 - 68 g/kg), tienen minerales como K, Zn, Ca y Fe, y bajos niveles de Na y P (Oshodi & Aletor, 1993). Otro ejemplo de leguminosa es el aberjón (*Lupinus gredensis*) que tiene un contenido proteico de 238 g/kg y una digestibilidad *in vitro* de la proteína de 82.3 % (Pastor *et al.*, 2009).

### 2.3 Hidrólisis de proteínas

Para liberar péptidos con actividades biológicas, los cuales se encuentran encriptados dentro de cadenas de proteínas, es necesaria una hidrólisis de estas proteínas (García *et al.*, 2013). En la Figura 1 se esquematizan los tipos de hidrólisis, en los cuales destacan la enzimática y fermentación microbiana de proteínas alimenticias. Otras fuentes proteolíticas ampliamente usadas en la producción de hidrolizados son las bacterias comerciales y proteasas fúngicas (Irshad Kanekanian, Peters & Masud, 2013).

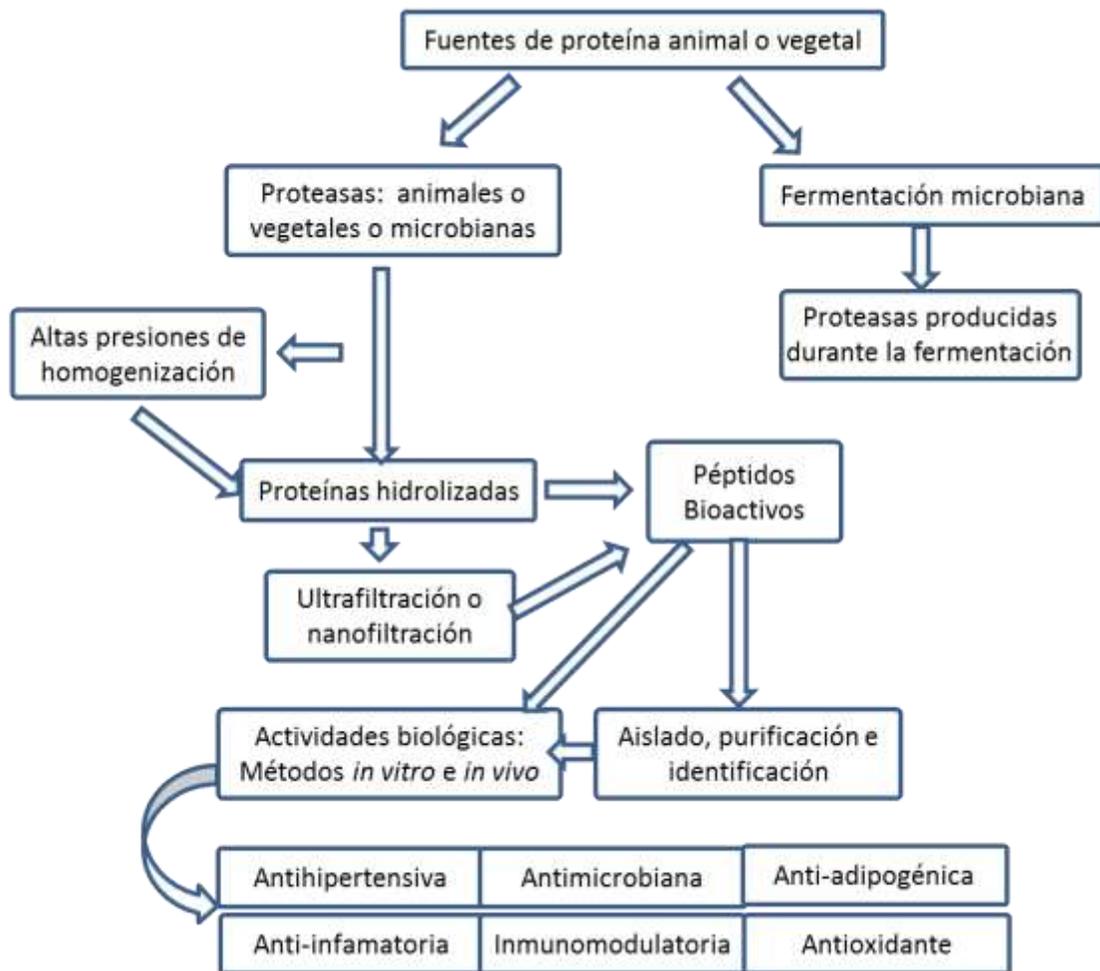


Figura 1. Obtención de biopéptidos.

Fuente: (Hafeez *et al.*, 2014)

Dentro de los métodos de hidrólisis enzimática, las enzimas pancreáticas, (principalmente la tripsina), han sido usadas para liberar péptidos bioactivos conocidos de las proteínas alimenticias. Otras enzimas y combinaciones diferentes de enzimas, incluyendo Alcalasa<sup>®</sup>, quimotripsina, pancreatina y pepsina, así como de fuentes bacterianas y fúngicas, han sido aplicadas para generar péptidos bioactivos a partir de varias fuentes proteicas (Korhonen & Pihlanto, 2003).

La hidrólisis enzimática puede mejorar las propiedades fisicoquímicas, funcionales y sensoriales de las proteínas nativas sin afectar su valor nutricional (Kristinsson & Rasco, 2000). La combinación de las técnicas de hidrólisis, además de aumentar la cantidad de péptidos en los productos fermentados, da lugar a diversos efectos biológicos y funcionales (Hafeez *et al.*, 2014). Como ejemplo, para la actividad antihipertensiva, además de una combinación adecuada de enzima - fuente proteica, deben considerarse la influencia de otros parámetros tales como pH, temperatura, relación enzima sustrato, tiempo de hidrólisis y sus efectos interactivos, para así tener una completa optimización del proceso de hidrólisis (Irshad *et al.*, 2013).

Asimismo, la hidrólisis puede aumentar las actividades biológicas. Ketnawa, Martínez, Benjku & Rawdkue (2015) evaluaron la capacidad de diferentes proteasas alcalinas para preparar hidrolizados a partir de piel de pescado, encontrando que todos los índices de actividad antioxidante de los hidrolizados aumentaron con el grado de hidrólisis. Chen, Tsai & Pan (2007) estudiaron un proceso combinado de hidrólisis para aumentar la actividad antihipertensiva de péptidos bioactivos de leche, usando la proteasa microbiana Prozyme 6 de *Aspergillus* y una mezcla de cultivo comercial de cinco bacterias de ácido láctico.

El grado de hidrólisis (GH) está definido como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos con respecto al número total de enlaces peptídicos (Ketnawa *et al.*, 2015). Este valor es útil para saber la efectividad de las enzimas

proteolíticas para hidrolizar las cadenas de proteínas y así liberar péptidos de interés.

#### **2.4 Digestión gastrointestinal simulada**

Aunque los estudios en animales y humanos son la mejor manera de evaluar la eficacia de los péptidos bioactivos, los ensayos simulados son más rápidos y de bajo costo. La digestión gastrointestinal suele simularse digiriendo secuencialmente proteínas con pepsina (pH 2, 37 °C) y pancreatina (pH 7.5, 37 °C) y, en algunas ocasiones, también se realiza la digestión con quimotripsina y tripsina (pH 6.5-6.8, 37 °C) (García *et al.*, 2013).

La combinación de pepsina-pancreatina o pepsina-quimotripsina-tripsina es usualmente usada para simular la degradación gastrointestinal de proteínas alimenticias en humanos. Es por ello que estas enzimas de origen tanto animal como microbiano son muy utilizadas (Irshad *et al.*, 2013; Hartmann & Meisel, 2007).

Péptidos producidos por digestión *in vitro* pueden diferir de los generados *in vivo* porque las condiciones de esta última pueden ser difícilmente reproducibles, tales como la enzima, la relación sustrato, tiempo de reacción y pH, las cuales controlan la digestión y pueden cambiar a través de la digestión *in vivo* (Ekmekcioglu, 2002).

Se ha reportado que la tripsina tiene especificidad hacia la arginina y la lisina. La pepsina por otro lado actúa preferencialmente sobre Phe, Tyr, Trp y Leu (Antal *et al.*, 2001). Gasteiger *et al.* (2005) reportaron que los péptidos liberados por la pepsina son hidrofóbicos mientras que los liberados por la tripsina son hidrofílicos.

La prevalencia de las actividades biológicas de los péptidos ante las proteasas gastrointestinales (tales como pepsina, tripsina, quimotripsina, etc.) es un requisito previo para su acción *in vivo* y para su aplicación en alimentos

funcionales. De hecho, varios péptidos resistentes a la digestión gastrointestinal pueden ser absorbidos en su forma intacta a través del intestino (Daniel, 2004).

Dependiendo del número y/o secuencia de los aminoácidos, los péptidos bioactivos derivados de alimentos pueden presentar diversas actividades, uniéndose a un receptor específico en el tracto gastrointestinal o en órganos y tejidos después de su absorción en el torrente sanguíneo (Erdmann *et al.*, 2008). Algunos autores han empleado también la digestión gastrointestinal para demostrar actividad hipotensiva en algunos alimentos vegetales tales como soya, espinaca, alforfón, guisante, girasol, y semilla de cáñamo (García *et al.*, 2013).

## **2.5 Distribución de pesos moleculares**

La distribución de pesos moleculares, permite conocer los diferentes tamaños de moléculas presentes en un hidrolizado de proteína, y es importante diferenciarlos porque cada tamaño corresponde a péptidos con diferentes actividades biológicas. Las unidades usadas para pesos moleculares son kilodaltones (kDa). La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) es un método empleado en la separación de macromoléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas. Un campo eléctrico carga las partículas y permite su separación. Muchas macromoléculas tales como los aminoácidos, los péptidos, las proteínas, los nucleótidos y los ácidos nucleicos poseen grupos ionizables y, a un pH determinado, existen en solución como especies cargadas eléctricamente, sean cationes o aniones. Dependiendo de la naturaleza de la carga neta, las partículas cargadas migrarán hacia el cátodo o hacia el ánodo. En la electroforesis una tensión eléctrica es aplicada a los electrodos en ambos extremos del gel. Las propiedades de una molécula determinan la velocidad en la cual un campo eléctrico puede desplazarla a través del gel (Carrillo, Lugo, Espinoza & Noriega, 2016).

Farvin, Baron, Niesen & Jacobsen (2010) determinaron péptidos con propiedades antioxidantes a partir de leche enriquecida con aceite de pescado; durante la evaluación se observó que las fracciones moleculares más bajas (3 - 10 kDa y <3 kDa) tienen mayor efecto sobre la actividad quelante de hierro en comparación a fracciones con alto peso molecular..

## **2.6 Actividad antioxidante**

Un antioxidante puede ser definido como aquella sustancia que en baja concentración respecto a un sustrato oxidable disminuye o inhibe la oxidación del mismo. Esta definición incluye antioxidantes no enzimáticos así como los enzimáticos (Sies, 1997).

La producción de especies reactivas de oxígeno y radicales libres durante el metabolismo, es un proceso regular e importante. En los radicales libres, un electrón desapareado siempre busca otro electrón para ser estabilizado. Este electrón desapareado hace al radical libre muy reactivo. El proceso anterior es balanceado por el sistema interno antioxidante del cuerpo. Pero este balance puede ser afectado por el ambiente, estilo de vida y situaciones patológicas, las cuales permiten un acumulamiento de radicales libres, resultando en un estrés oxidativo el cual juega un papel importante en la causa de enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras enfermedades crónicas las cuales son la mayor causa de muerte en el mundo (Willcox, Ash & Catignani, 2004).

Debido a los potenciales riesgos para la salud que tendría el uso de antioxidantes artificiales (Halliwell & Whiteman, 2004), en los últimos años se ha buscado reemplazarlos en los alimentos por antioxidantes naturales. Esto ha motivado a la obtención de péptidos por síntesis o, degradación proteica por acción de proteasas.

Los compuestos antioxidantes pueden estar presentes en los alimentos y su búsqueda es de gran interés no sólo por razones de salud, sino también por su relación con las propiedades organolépticas de los alimentos. De hecho, la

oxidación de lípidos mediada por radicales en los alimentos produce sabores rancios, decoloración de los alimentos y compuestos tóxicos indeseables que conducen al deterioro de la calidad y al menor tiempo de conservación. La adición de antioxidantes sintéticos en el procesamiento de alimentos es una práctica común para evitar estos problemas. Sin embargo, el uso de antioxidantes sintéticos está limitado por su carcinogenicidad y riesgos para la salud (Bu, Li & Yang, 2005).

Entre estos alimentos, los péptidos derivados de las proteínas lácteas son fuentes dietéticas de antioxidantes naturales, ya que inhiben la peroxidación lipídica tanto enzimática como no enzimática, principalmente mediante la depuración de radicales libres de ácidos grasos (Ricci, Herrera & Artacho, 2012).

En algunas proteínas de origen alimentario se ha encontrado actividad de atrapamiento de especies activas de oxígeno. Los antioxidantes tienen diferentes mecanismos de acción, así, las proteínas pueden inhibir la oxidación lipídica por la inactivación de especies reactivas de oxígeno, atrapamiento de radicales libres, reducción de hidroperoxidasas y por cambios de las propiedades físicas del sistema alimenticio. Estas habilidades antioxidantes de las proteínas las hace un potencial candidato para ser usadas como aditivos antioxidantes en procesos alimenticios (Mendis, Rajapakse & Kim, 2006).

De igual forma se han encontrado propiedades antioxidantes que previenen la peroxidación enzimática (lipoxigenasa) y no enzimática de ácidos grasos esenciales en péptidos derivados de proteínas de la leche. La mayoría de los péptidos identificados se encuentran encriptados en la secuencia de la  $\alpha$ -caseína (FitzGerald & Murray, 2006). La adición de un residuo de leucina o prolina al extremo N de un dipéptido His-His, por ejemplo, puede aumentar la actividad antioxidante y facilitar la sinergia adicional con antioxidantes no péptidicos como BHT o BHA (hidroxianisol butilado o tolueno) (Kitts & Weiler, 2003).

Wang & de Mejía (2005) mostraron que algunos aminoácidos como, His, Trp, Tyr y Lys, tienen propiedades antioxidantes. Suetsuna, Ukeda & Ochi (2000) aislaron e identificaron péptidos con actividad antioxidante a partir de una digestión peptídica de caseína. El péptido Tyr-PheTyr-Pro-Glu-Leu tuvo una fuerte actividad de liberación de radicales de aniones superóxido, atribuida principalmente al dipéptido del aminoácido C-terminal Glu-Leu.

Diferentes factores parecen afectar la actividad antioxidante de los hidrolizados de las proteínas vegetales, tales como el peso molecular, concentración de hidrolizado, grado de hidrólisis y composición de aminoácidos. Diversos péptidos antioxidantes utilizados presentan una gran cantidad de aminoácidos hidrófobos tales como Leu, Ala y Phe (García *et al.*, 2013).

Medina *et al.* (2012) demostraron recientemente que los aminoácidos Val y Leu ejercen propiedades antioxidantes cuando se encuentran en el N-terminal de un péptido. Por otro lado, Tyr y Trp ejercen propiedades antioxidantes cuando se encuentran en el extremo C-terminal. Además, esta actividad está relacionada con la presencia de secuencias ricas en histidina y aminoácidos hidrófobos que proporcionan una mayor accesibilidad de los péptidos a sus destinos hidrofóbicos (Chen Muramoto & Yamauchi, 1998).

Una técnica utilizada para determinar la capacidad antioxidante es el DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) que mide la capacidad de depuración de los compuestos ensayados sobre los radicales libres del DPPH. El procedimiento consiste en mezclar el péptido con DPPH en etanol o metanol, una incubación bajo protección de luz a temperatura ambiente y medición de absorbancia de DPPH en un rango de 515 - 517 nm, causando un decoloramiento de la molécula de DPPH, la cual es proporcional a la concentración de antioxidantes (Sharma & Bhat, 2009).

La medición de la actividad antioxidante por métodos *in vivo* se basa principalmente en mediciones de la actividad enzimática. La disminución de las

actividades de enzimas antioxidantes, como la catalasa, la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa y la glutatión-transferasa, que pueden afectar de forma dramática la susceptibilidad de tejidos al estrés oxidativo y por tanto están asociadas con varias enfermedades (Ktari *et al.*, 2014).

## **2.7 Actividad antihipertensiva**

La ECA-I es una dicarboxipeptidasa que cataliza la producción de la angiotensina II, y de la inactivación del vasodilatador bradikinina. La angiotensina II es un potente vasoconstrictor, el cual estimula la liberación de aldosterona y hormona antidiurética o vasopresina, incrementa la retención de sodio y agua y la regeneración de la renina (Sharma & Kortas, 2004). Esta enzima ECA-I juega un papel importante en la regulación de la presión sanguínea y la hipertensión (Yamamoto, Akino & Takano, 1994).

La influencia de la ECA-I sobre la presión sanguínea la ha hecho un objetivo ideal, y varios inhibidores sintéticos de la ECA-I, como el captopril, enalapril y lisinopril han sido desarrollados en el tratamiento clínico de la hipertensión. Un efecto secundario común de estos inhibidores es una tos seca que aparece en un 5 - 20 % de los pacientes, lo que puede hacer discontinuar el tratamiento. Otro problema serio es la angiodema, que puede influir sobre el 0.1 - 0.5 % de los pacientes y puede poner en peligro la vida. También son fetotóxicos, causando falla renal, malformaciones congénitas y muerte (Pryd, Sedman, Nugent & Barr, 1993; Cooper, Hernández, Arbogast & Dubley, 2006).

A fin de evitar lo anterior, se han obtenido péptidos inhibidores potentes de ECA-I a partir de hidrolizados de diversos alimentos incluyendo: leche, pescado, huevos, cereales, soya y proteínas de músculo (Hong *et al.*, 2008).

La  $\beta$  lactoglobulina, es uno de los mayores componentes del suero de leche que ha mostrado contener diferentes secuencias de péptidos bioactivos de acuerdo a la enzima usada. La tripsina libera diversos péptidos bioactivos

incluyendo los péptidos inhibidores ECA-I  $\beta$ -lg 15–20,  $\beta$ -lg 102–105 y  $\beta$ -lg 142–148 (Mullaly, Meisel & FitzGerald, 1997; FitzGerald & Meisel, 2000).

La antihipertensividad es la principal bioactividad que se encuentra en los péptidos derivados de los alimentos vegetales (García *et al.*, 2013). Glu-Phe, Ile-Arg y Lys-Phe, son dipéptidos de la digestión de proteínas de guisantes, en los cuales se ha reportado que presentan actividad inhibitoria ECA-I (Li & Aluko, 2010).

Comparadas con las drogas inhibitorias ECA-I, estos péptidos derivados de alimentos parecen más naturales y seguros para los consumidores. Como parte de una dieta diaria, estos pueden representar un costo mucho menor para el cuidado de la salud.

La manera más común de producir péptidos inhibidores ECA-I es a través de la hidrólisis enzimática de proteínas alimenticias. La especificidad de la enzima proteolítica y las condiciones del proceso, influyen en la composición de péptidos del hidrolizado por tanto de su actividad inhibitoria ECA-I (Van der Ven, Gruppen, Bont & Voragen, 2002).

Péptidos inhibidores ECA-I son generalmente secuencias cortas, lo cual corresponde a los resultados propuestos por Natesh, Schwagner, Sturrock & Acharya (2003) quienes mostraron que los sitios activos de la ECA-I no pueden acomodar moléculas de péptidos largos. Algunos péptidos tienen arginina en su penúltima posición, lo que de acuerdo a lo sugerido por Rohrbach, Williams & Rolstad (1981) un aminoácido cargado positivamente en la penúltima posición tiene un efecto positivo en el enlace péptido-enzima.

Muchos péptidos inhibidores de la ECA-I tienen en común propiedades estructurales en las que están incluidas: tamaño pequeño, presencia de residuos hidrofóbicos (aromáticos o de cadenas laterales ramificada) además de residuos de prolina, arginina o lisina (Murray & FitzGerald, 2007).

La ECA-I parece tener una preferencia a un sustrato o inhibidor competitivo que contiene aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos o de cadenas ramificadas) en el tripéptido C-terminal. Estudios de inhibición ECA-I con dipéptidos mostraron que la C-terminal de la fenilalanina, prolina, triptófano, o residuos de tirosina son más efectivos en el enlace de sustratos y aminoácidos alifáticos ramificados en el N-terminal (Byung & Kim, 2001)

Péptidos inhibidores ECA-I competitivos son los más frecuentemente reportados y han sido identificados de extractos de hidrolizados de proteína de garbanzo (Pedroche, Yust, Giron, Alaiz & Voque, 2002) y soya (Wu & Ding, 2002). Estos inhibidores pueden enlazarse al sitio activo y bloquearlo, o al sitio de unión del inhibidor que está alejado del sitio activo para alterar la conformación enzimática de tal manera que el sustrato ya no se une al sitio activo.

La mayoría de los péptidos inhibidores de la ECA-I presentan secuencias cortas que van de 2 a 12 aminoácidos. Los mejores péptidos antihipertensivos contienen aminoácidos hidrófobos tales como Pro, especialmente, en posición C-terminal o aminoácidos cargados positivamente como Lys o Arg en posición C-terminal (Puchalska, Marina & García, 2011). Yust *et al.* (2003) demostraron que los péptidos cortos contienen el aminoácido Met en combinación con otros aminoácidos hidrofóbicos, son una buena fuente de inhibidores ECA-I. Alemán, Gímenez, Pérez, Gómez & Montero (2011) informaron que los residuos de Leu o Hyp desempeñan un papel importante en la actividad inhibidora ECA-I cuando se presentan juntos en la cadena de secuencia del fragmento activo.

Varios métodos han sido usados para cuantificar la actividad inhibitoria ECA-I de péptidos derivados de plantas alimenticias. En todos los casos, la enzima está presente con un péptido. La medición está dada por la detección de productos formados. El método original desarrollado por Cushman and Cheung es uno de los más ampliamente adoptados por autores posteriores con modificaciones menores (Guang & Phillips, 2009). Este método

espectrofotométrico se basa en la hidrólisis del sustrato hipuril-histidil-leucina (HHL) por ECA-I para producir ácido hipúrico (HA) e histidil-leucina. El ácido hipúrico se extrae en acetato de etilo y se cuantifica midiendo absorbancia a 228 nm (García *et al.*, 2013).

Los ensayos en vivo de la actividad inhibitoria ECA-I se llevan a cabo midiendo la respuesta de la presión sanguínea en ratas espontáneamente hipertensas después de la administración oral o por inyección intravenosa de los péptidos sintetizados (Guang & Phillips, 2009).

Una forma de reportar los valores de actividad biológica, tanto para péptidos antioxidantes como hipertensivos, es el valor de  $IC_{50}$ , definido como la concentración requerida para inhibir al 50 % un agente oxidante (para actividad antioxidante) o la ECA-1 (para actividad antihipertensiva). Al reportar los valores de  $IC_{50}$ , debe señalarse la diferencia en el uso de las unidades  $\mu\text{g/mL}$  para los extractos, de las unidades  $\mu\text{M}$  usadas para los péptidos puros finales, cuestión que complica una comparación directa entre ellos (Irshad *et al.*, 2013).

## **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 Materiales**

#### **3.1.1 Material vegetal**

El alberjón fue obtenido en un mercado local del Municipio de Texcoco, Edo. de México, mientras que la haba de El Labrador S.A. de C.V., México (lugar de envasado).

#### **3.1.2 Enzimas**

Flavourzyme<sup>®</sup> 1000 L (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark), ECA-1 (No Cat: A6778-2UN), pepsina y pancreatina (Sigma Aldrich<sup>®</sup> Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, E.U.).

#### **3.1.3 Reactivos**

Folin-ciocalteu-fenol (2 N), Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS), 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) e hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL) fueron obtenidos de Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, USA). Todos los reactivos empleados para la electroforesis fueron de la marca Bio-Rad<sup>®</sup> (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA).

#### **3.1.4 Equipos**

Cámara de electroforesis Mini Protean (Bio-Rad<sup>®</sup> Hercules, CA, USA), baño térmico (OVAN México), liofilizadora (Lyph Lock<sup>®</sup> 6, Labconco, MS, Kansas, USA), centrífuga (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania), espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific<sup>™</sup>, MA, Waltham, USA), estufa de secado convectivo (Riossa Digital HCF-62, Monterrey, México).

### **3.1.5 Diseño estadístico**

Todos los ensayos se condujeron de acuerdo a un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Se aplicó un análisis de varianza y comparación de medias de tratamientos (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ) mediante el paquete estadístico SAS<sup>®</sup> (versión 9.4).

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Obtención de hidrolizados**

Para los hidrolizados obtenidos con el complejo proteolítico Flavourzyme<sup>®</sup> 1000 L (complejo fúngico de proteasa / peptidasa producido por fermentación sumergida de una cepa seleccionada de *Aspergillus oryzae*, con actividades endoproteasa y exopeptidasa), la extracción de proteínas se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Alsohamy, Sitohy & El-Masry (2007). Se pesaron 50 g de harina y se suspendieron en 1 L de agua destilada. Se ajustó el pH a 11 y la temperatura a 25 °C y se mantuvo por 30 min en agitación. La suspensión fue centrifugada a 6000 g por 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue colectado, se ajustó el pH a 7 y la temperatura a 50 °C por 30 min con agitación. Se agregó la enzima Flavourzyme<sup>®</sup> 1000 L a razón de 125 LAPU g<sup>-1</sup> proteína y se mantuvo en agitación por 6 h. La suspensión fue centrifugada a 10000 g por 30 min a 4 °C. El sobrenadante fue filtrado con papel Whatman 41, congelado a -20 °C y liofilizado (Lyph Lock<sup>®</sup> 6, Labconco, MS, Kansas, USA). También se utilizaron hidrolizados obtenidos por fermentación en medio sólido por *Aspergillus niger* GH1 cuya proteólisis se llevó a cabo por las proteasas sintetizadas durante este proceso.

### **3.2.2 Obtención de aislados de proteína**

Se usó la metodología propuesta por Vioque, Alaiz & Girón (2012) con algunas modificaciones. Se preparó una suspensión de harina al 10 % (p/v) la cual se mantuvo en agitación por 10 min. Se ajustó el pH a 9.5 y se mantuvo en agitación durante 30 min. La suspensión fue centrifugada a 3438 g por 15 min a

4°C. Se colectó el sobrenadante y se realizaron dos filtrados con papel Whatman 1 y 41, respectivamente. Se ajustó el pH al punto isoeléctrico y se mantuvo la agitación por 30 min. La suspensión fue nuevamente centrifugada a 4951 g por 15 min a 4°C y se colectó el precipitado, el cual fue secado en estufa a 35 °C por 24 h. La proteína seca fue macerada en un mortero hasta obtener un polvo fino el cual fue almacenado hasta su uso.

### **3.2.3 Cuantificación de proteína**

Esta determinación fue necesaria para dosificar las enzimas usadas de acuerdo al contenido proteico de los hidrolizados y aislados. Se realizó por el método de Lowry modificado (Peterson, 1977). Se colocó 1 mL de muestra en frascos de vidrio ámbar, posteriormente se agregó 1 mL de una solución formada por una mezcla formada por carbonato de sodio (33.4 mg/mL), sulfato de cobre (0.33 mg/mL), tartrato de sodio y potasio tetra hidratado (0.66 mg/mL), hidróxido de sodio (10.7 mg/mL) y dodecil sulfato de sodio (33.3 mg/mL). Se dejó en reposo durante 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se agregaron 0.5 mL de reactivo de folin-ciocalteu (0.3 N). Se dejó en reposo durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se midió absorbancia a 750 nm y los valores obtenidos se interpolaron con un modelo obtenido a partir de una curva estándar de BSA (0 - 0.1 mg/mL).

### **3.2.4 Digestión gastrointestinal simulada**

Se empleó la metodología propuesta por Ketnawa *et al.* (2015). Con base al contenido proteico de cada hidrolizado, empleandose la cantidad necesaria para tener una suspensión al 3 % (p/p) de proteína. Se ajustó el pH a 2 con HCl 6 N. Posteriormente, se agregó pepsina 4 % (p/p) con base al contenido de proteína y la mezcla se mantuvo con agitación lenta a una temperatura de 37 °C por 2 h. Una vez concluido este periodo, se ajustó el valor de pH a 7.5 con NaOH (6 N). Se agregó pancreatina al 10 % (p/p) respecto a la proteína total. La mezcla se mantuvo con agitación lenta a 37 °C por 2 h. Se tomaron alícuotas a las 0, 2 y 4 h del proceso de digestión. Las alícuotas se colocaron a

ebullición por 10 min para inactivar las enzimas, se centrifugaron a 9000 g por 10 min (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se almacenaron en viales a -20 °C hasta su uso. Las muestras que fueron sometidas a este proceso fueron las siguientes: AE, AF, HE y HF. Así mismo, fueron sometidos a este proceso los aislados de proteína de alberjón y haba.

### **3.2.5 Distribución de pesos moleculares**

El análisis de distribución de pesos moleculares se realizó mediante la técnica de electroforesis (SDS-PAGE) reportada por Laemmli (1970) con un gel de separación de poliacrilamida (12 % de entrecruzamiento). Se empleó una cámara de electroforesis Mini-Protean II<sup>®</sup> (BIO-RAD<sup>®</sup>). Los geles fueron teñidos por 30 min con azul brillante de Coomassie G-250 al 0.01 % (p/v) en ácido acético 10 % (v/v) y metanol 40 % (v/v), desteñidos en una disolución que contenía ácido acético 10 % (v/v) y metanol 40 % (v/v). El marcador empleado de pesos moleculares incluye proteínas con pesos moleculares en un rango de 10 – 250 kDa (Kaleidoscope<sup>™</sup> #161- 0375, Bio-Rad<sup>®</sup> Hercules, CA, USA).

### **3.2.6 Grado de hidrólisis**

Se realizó de acuerdo al método reportado por Adler-Nissen (1979) con algunas modificaciones. Se preparó una mezcla conformada por 1 mL de amortiguador de fosfatos (0.2 M) pH 8.2, 64 µL de muestra y 0.5 mL de ácido 2 4 6 - trinitrobencensulfónico al 0.01 % (v/v). La mezcla se colocó en baño maría durante 30 min a 50 °C. Al cabo de ese tiempo, se agregó 1 mL de sulfito de sodio 0.1 M para detener la reacción. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 min. Se midió absorbancia a 420 nm y los valores obtenidos fueron interpolados usando una curva de L-leucina (0 - 6 mM).

Adicionalmente, se realizó una hidrólisis ácida a las muestras de péptidos de leguminosas como se describe a continuación. En primer lugar, se pesaron 0.5 g de harina de cada leguminosa y se colocaron dentro de una ampollita de vidrio, se agregaron 4.5 mL de HCl (6 N). La ampollita sellada se incubó en una

estufa (Riossa Digital HCF-62, Monterrey, México) a 100 °C durante 24 h. Al término de este periodo se agregaron 4.5 mL de NaOH (6 N) para neutralizar la mezcla. Posteriormente, se filtró con papel Whatman No. 41 y al filtrado obtenido se aplicó la metodología descrita para calcular la cantidad de grupos  $\alpha$ -amino terminales totales. El grado de hidrólisis se calculó con la Ecuación (1):

$$\% \text{ GH} = \frac{(\text{NH}_{2\text{tx}} - \text{NH}_{2\text{to}})}{(\text{NH}_{\text{HT}} - \text{NH}_{2\text{to}})} * 100 \quad (1)$$

Donde,  $\text{NH}_{2\text{tx}}$  es la cantidad de grupos  $\alpha$ -amino terminales al tiempo x de hidrólisis,  $\text{NH}_{2\text{HT}}$  es la cantidad de grupos  $\alpha$ -amino terminales totales y  $\text{NH}_{2\text{to}}$  es la cantidad de grupos  $\alpha$ -amino terminales al tiempo cero.

### 3.2.7 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por Soares de Castro y Harumi (2014), empleando el radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). De cada muestra (0, 2 y 4 h) de digestión gastrointestinal simulada se prepararon cinco diluciones seriales (0 - 6 mg/mL) de proteína. En frascos ámbar se agregaron 0.5 mL de dilución. Seguido, se adicionaron 1.5 mL de DPPH 0.08 mM en metanol al 80 % (v/v). Adicionalmente, se preparó un control que contenía 0.5 mL de agua destilada en sustitución de la muestra y DPPH 0.08 mM en metanol al 80 % (v/v), y un blanco que consistió en 0.5 mL de agua destilada y 1.5 mL de metanol al 80 % (v/v). Las mezclas se agitaron y dejaron en reposo durante 1 h. Al término, se midió absorbancia a 515 nm (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific™, MA, Waltham, USA) y se calculó el porcentaje de inhibición del radical DPPH mediante la Ecuación (2):

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \frac{A_{515\text{Control}} - A_{515\text{Muestra}}}{A_{515\text{Control}}} * 100 \quad (2)$$

Con los porcentajes de inhibición vs. la concentración de las diluciones de cada muestra se obtuvo un modelo matemático, el cual a su vez se empleó para calcular el valor de  $\text{IC}_{50}$ , el cual se define como la concentración necesaria de péptidos para inhibir al 50 % el radical DPPH.

### 3.2.7 Actividad antihipertensiva

Se usó la metodología propuesta por Cushman y Cheung (1971) con algunas modificaciones. Se prepararon diluciones (3 -15 mg<sub>proteína</sub>/mL) de las alícuotas obtenidas durante la digestión simulada en amortiguador de borato (0.1 M) pH 8.3 con NaCl (0.3 M). La mezcla de reacción consistió en 100 µL de muestra y 100 µL de ECA-1, misma que se pre-incubó a 37 °C por 20 min. Posteriormente se agregaron 200 µL de sustrato hipuril-histidil-leucina (5 mM) en amortiguador de borato (0.1 M) pH 8.3 con NaCl (0.3 M). La reacción transcurrió durante 45 min a la misma temperatura y se detuvo con la adición de 300 µL de HCl (1 N). A continuación, se agregó a cada tubo 1 mL de acetato de etilo y la mezcla fue centrifugada a 6000 g (10 min, 4 °C). Del sobrenadante se tomaron 750 µL y colocaron en baño a ebullición por 15 min para evaporar el disolvente. Se agregaron 1.6 mL de agua destilada para resuspender el ácido hipúrico y se midió absorbancia a 228 nm. Los porcentajes de inhibición ECA-I (Ecuación 3) vs. la concentración de péptidos, sirvieron para generar modelos con los que se calculó el valor IC<sub>50</sub>, definido como la concentración requerida de péptidos o proteínas nativas (mg/mL) para inhibir el 50 % de la actividad de la ECA-I.

$$\% \text{ actividad inhibitoria ACE} - I = \frac{(A_{228\text{control}} - A_{228\text{muestra}})}{(A_{228\text{control}} - A_{228\text{testigo}})} * 100 \quad (3)$$

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Grado de hidrólisis

Esta determinación permite conocer si existe un efecto de las enzimas en la ruptura de cadenas de las proteínas. En la Figura 2 se presentan los porcentajes del grado de hidrólisis correspondientes a cuatro hidrolizados y dos aislados de proteína que fueron sometidos a condiciones gastrointestinales simuladas. Después de analizar estadísticamente los valores correspondientes a 0, 2 y 4 h de digestión ( $\alpha = 0.05$ ), se observó que los péptidos de AE presentan un incremento significativo en el grado de hidrólisis después del proceso de digestión. Este último, no tuvo un efecto significativo sobre el grado de hidrólisis de los péptidos de AF. Para los péptidos de HE y HF se observó un aumento significativo del grado de hidrólisis después del proceso de digestión. Por último, ambos aislados (APA y APH) mostraron un aumento significativo en el grado de hidrólisis debido al proceso de digestión.

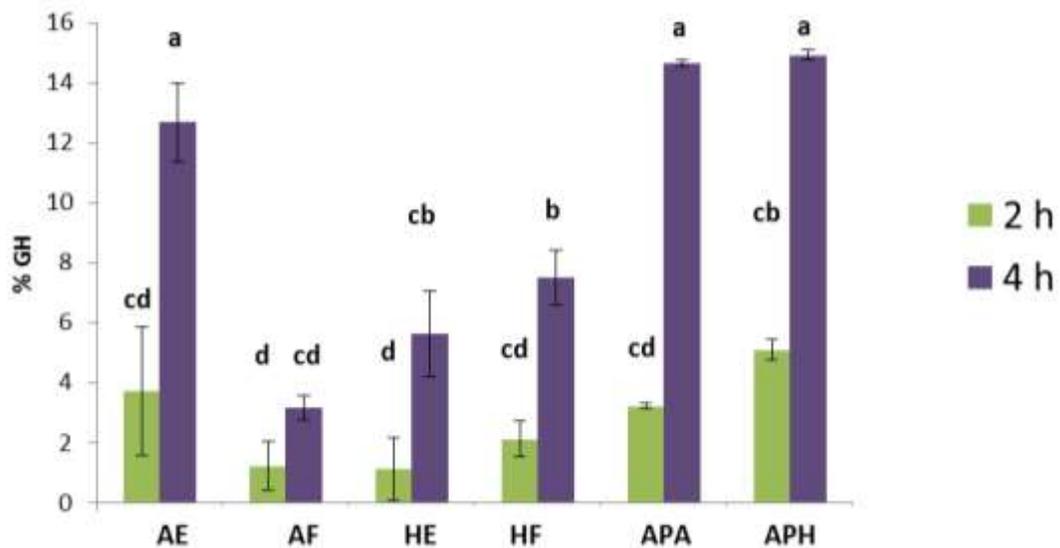


Figura 2. Efecto de la digestión gastrointestinal simulada sobre el grado de hidrólisis (%) de hidrolizados y aislados de proteína.

Se puede observar que a las 2 h de DGIS y por acción de la pepsina, los GH que han alcanzado todas las muestras es el mismo. La comparación múltiple también indica que ambos aislados y el AE tuvieron un mismo GH al término de la DGIS.

Zhou *et al.* (2016) reportaron que para hidrolizados de harina de colza obtenidos con tripsina, obtuvieron grados de hidrólisis entre 12 y 20 % después de someterlas a una digestión simulada en la que se modificaba la cantidad de enzima usada. Para los aislados y el AE se obtuvieron valores de GH dentro de este rango.

Betancur, Sosa, Ruiz, Segura & Chel (2014) obtuvieron hidrolizados a partir de proteína de frijol *var.* Jamapa usando Flavourzyme<sup>®</sup> (pH 7, 50 °C, 120 min) obteniendo valores de GH entre 8 y 14 %. Cuando los hidrolizados fueron obtenidos usando pepsina-pancreatina (pH 2 / 7.5, 37 °C, 120 min) obtuvieron valores de GH entre 24 y 28.4 %. Los valores reportados por este autor para el caso de Flavourzyme<sup>®</sup> coinciden con los obtenidos, pero los reportados con el uso de pepsina - pancreatina son mayores.

Kasera, Singh, Lavasa, Prasad & Arora (2015) obtuvieron hidrolizados de proteínas de alubia, frijol negro y cacahuate mediante la acción secuencial de Alcalasa<sup>®</sup> y Flavourzyme<sup>®</sup>. En los primeros 180 minutos de tratamiento con Alcalasa<sup>®</sup>, el GH de los hidrolizados de alubia, frijol negro y cacahuate fue de 37.3, 43.6 y 42.6 %, respectivamente incrementándose el GH con el tiempo. El tratamiento combinado de enzimas después de 480 min presentó un GH de 48.4, 63.5 y 69.4 % para los hidrolizados de alubia, frijol negro y cacahuate, respectivamente. El mayor GH reportando por este autor, en comparación a los obtenidos, puede deberse al uso adicional de Alcalasa<sup>®</sup>.

## 4.2 Distribución de pesos moleculares

La Figura 3 presenta la DPM del hidrolizado de alberjón obtenido por vía enzimática a diferentes tiempos de DGIS (0, 2 y 4 h). En esta se observa una clara disminución del tamaño de pesos moleculares conforme avanza el proceso de digestión. La mayoría de las proteínas y péptidos al inicio de la digestión presentan bandas en las zonas de 37, 20 y 15 kDa. Después de las 2 h y por acción de la pepsina, dejan de observarse péptidos con pesos de 20 a 37 kDa, y sólo se observan bandas en la zona de 15 kDa. Por último, al término de la digestión simulada, y por efecto de la acción de la pancreatina, se observan bandas de pesos moleculares por debajo de 10 kDa. El comportamiento que se observa en los tres tiempos de digestión indica que las enzimas causaron un rompimiento progresivo de las cadenas más largas de proteínas y péptidos obteniéndose al final péptidos de cadenas cortas.

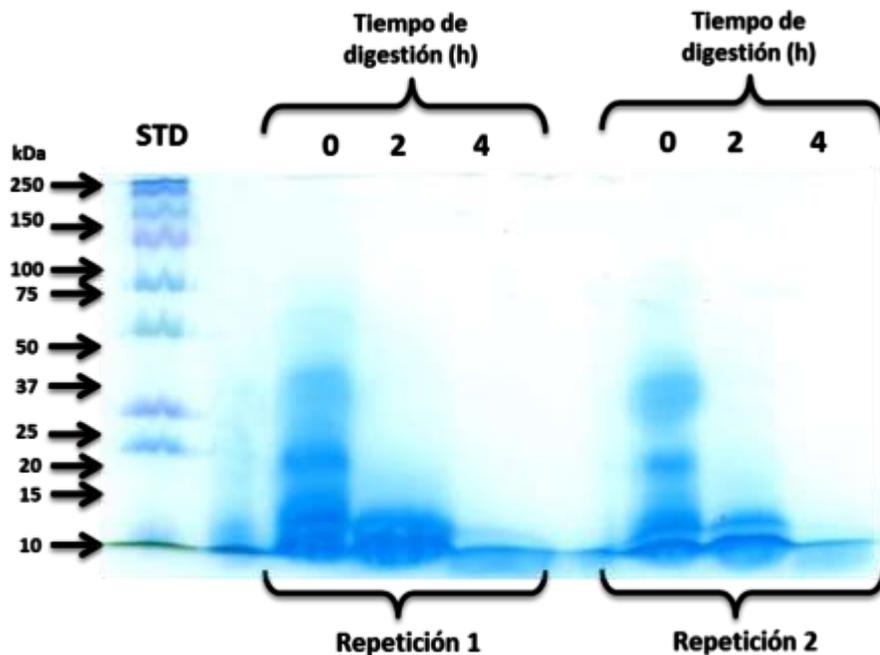


Figura 3. Distribución de pesos moleculares del hidrolizado de proteína de alberjón obtenido con Flavourzyme<sup>®</sup>, a diferentes tiempos de digestión gastrointestinal simulada.

En la Figura 4 se presenta la DPM del hidrolizado de alberjón obtenido por vía fermentativa a diferentes tiempos de DGIS (0, 2 y 4 h). Se observa un comportamiento muy similar al AE, ya que al inicio de la digestión se presentan bandas en las zonas de 37, 25, 20 y 10 kDa. Después de las 2 h y por efecto de la pepsina, sólo se observan bandas en la zona de 10 kDa, similar a lo observado al término de la DGIS, indicando que la pancreatina no participó significativamente en la reducción de pesos moleculares durante la segunda etapa de la digestión, a diferencia de la pepsina que durante la primera etapa del proceso digestivo redujo el tamaño molecular de los péptidos.

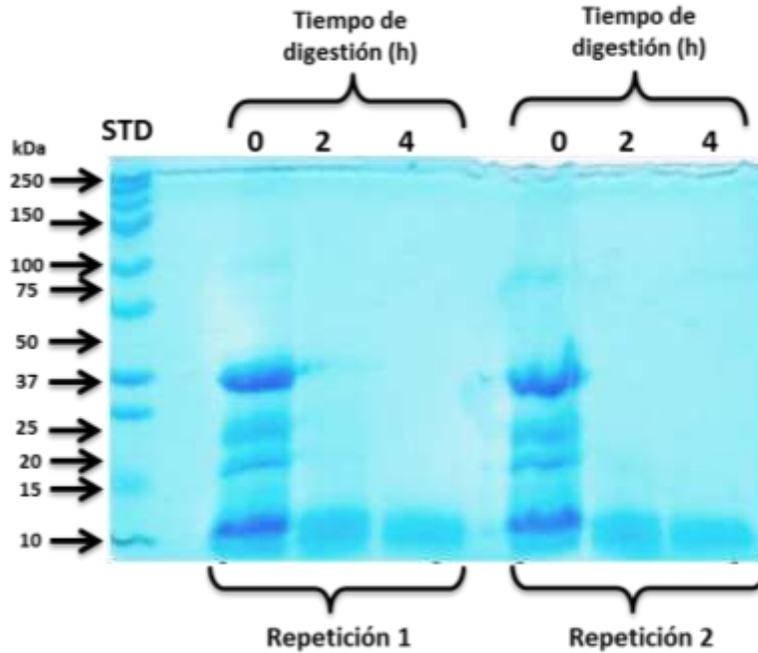


Figura 4. Distribución de pesos moleculares del hidrolizado de proteína de alberjón obtenido por fermentación en medio sólido, a diferentes tiempos de digestión gastrointestinal simulada.

En la Figura 5 se presenta la DPM del hidrolizado de haba obtenido por vía enzimática a los tres tiempos de DGIS (0, 2 y 4 h). En esta se observa que al inicio de la digestión se presenta una amplia distribución de pesos moleculares, encontrándose bandas desde 15, 20, 25, 37, 50, 75 y 100 kDa. Después de la acción de la pepsina a las 2 h de digestión, se observa que las moléculas de mayor peso se encuentran cercanas a 75 kDa, encontrándose también bandas de 50, 37, 15 y 10 kDa. Sin embargo, durante la segunda etapa de la digestión, en la cual actúa la pancreatina, no se observa ninguna banda dentro del rango de pesos moleculares, posiblemente porque los pesos moleculares obtenidos son menores a 10 kDa. En este caso, se observa que el efecto de la pancreatina sobre la reducción de pesos moleculares de HE fue mayor al observado por la pepsina durante las primeras 2 h de digestión.

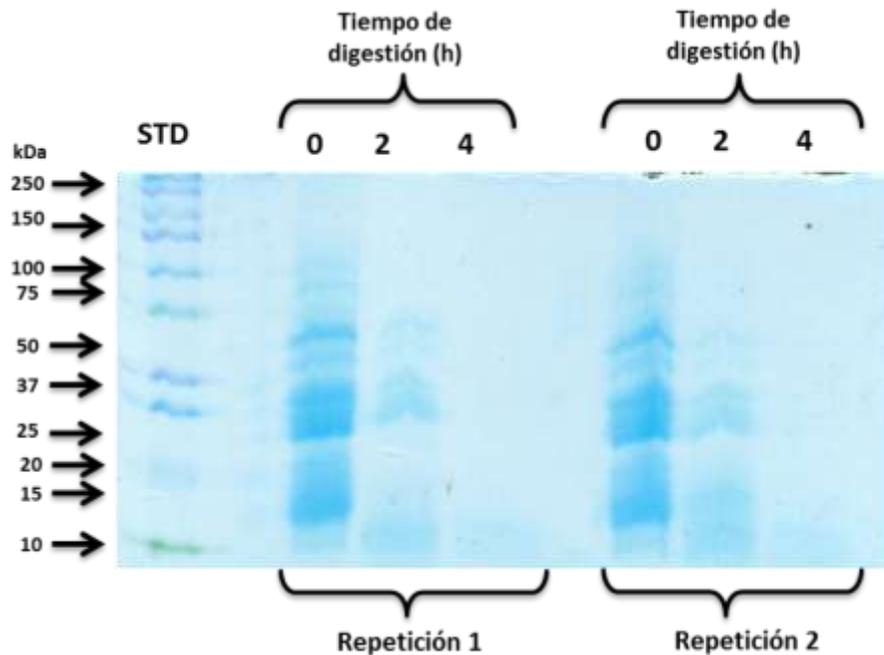


Figura 5. Distribución de pesos moleculares del hidrolizado de proteína de haba obtenido con Flavourzyme<sup>®</sup>, a diferentes tiempos de digestión gastrointestinal simulada.

La Figura 6 presenta la DPM del hidrolizado de haba obtenido por vía fermentativa a los tres tiempos de DGIS (0, 2 y 4 h). Para este hidrolizado se observa que al tiempo cero de la digestión se presenta una amplia distribución de pesos moleculares, abarcando un rango de 15 a 250 kDa. Después de la acción de la enzima pepsina a las 2 h de digestión, se observa que no hubo cambios en la distribución de pesos, encontrándose bandas de proteína desde 15 hasta cerca de 250 kDa. Esto indica que la pepsina no hidrolizó las proteínas de esta muestra. Por otra parte, la pancreatina si hidrolizó las cadenas de proteínas observándose bandas distribuidas entre 10 y 20 kDa. Comparando ambos hidrolizados se destaca que la pepsina hidrolizó más efectivamente las cadenas de proteína de HE que las de HF. Asimismo la pancreatina redujo en mayor proporción los pesos moleculares en el hidrolizado obtenido por vía enzimática que el obtenido por vía fermentativa.

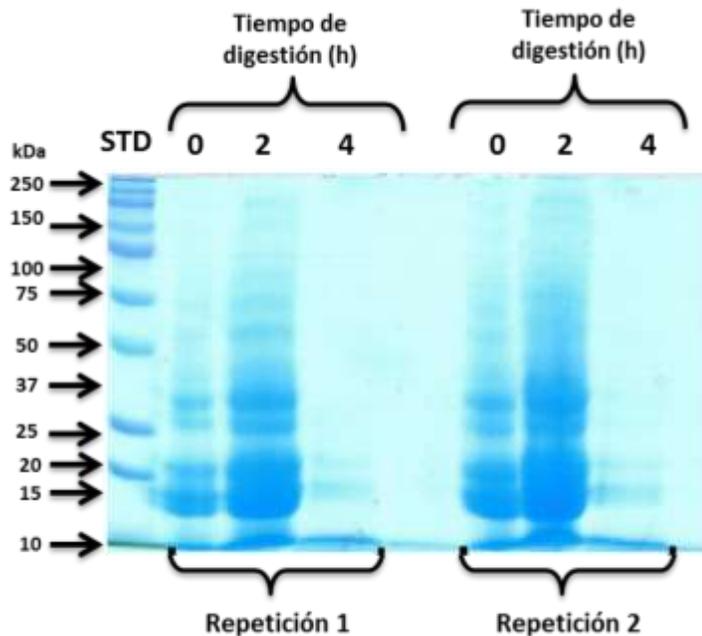


Figura 6. Distribución de pesos moleculares del hidrolizado de proteína de haba obtenido por fermentación en medio sólido, a diferentes tiempos de digestión gastrointestinal simulada.

La Figura 7 presenta la DPM del aislado de proteína de alberjón a los tres tiempos de DGIS (0, 2 y 4 h). En este gel se observa que al inicio del proceso digestivo el aislado se tiene una amplia distribución de pesos moleculares, desde 15 hasta 250 kDa. Después de la acción de la pepsina es posible que esta distribución se haya ampliado debido a una hidrólisis uniforme en todas las distribuciones y es por ello que las bandas están juntas una de otra. Después del proceso de DGIS y por acción de la pancreatinase observa una reducción de pesos moleculares entre 10 y 50 kDa.

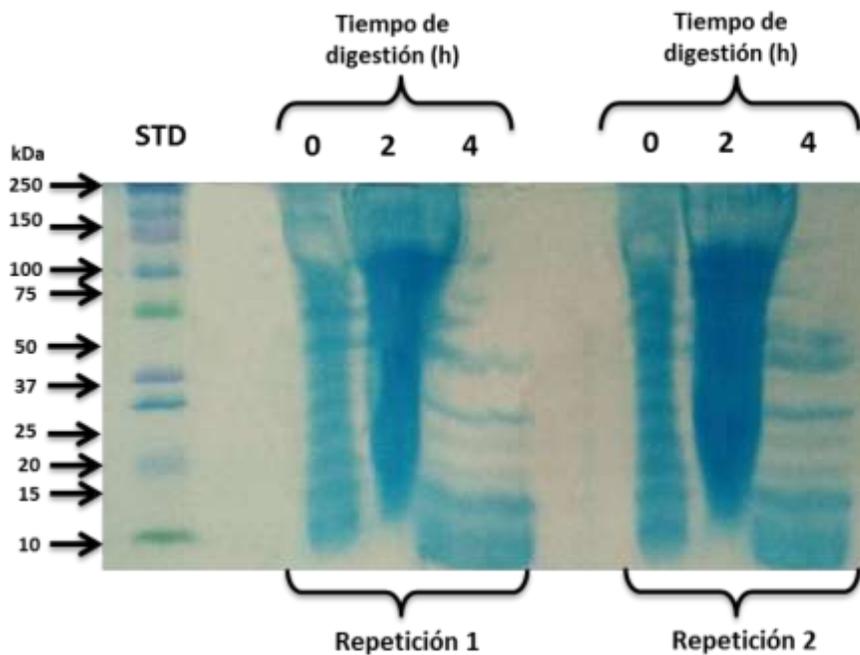


Figura 7. Distribución de pesos moleculares del aislado de proteína de alberjón, a diferentes tiempos de digestión gastrointestinal simulada.

Finalmente, en la Figura 8 se presenta la DPM del aislado de proteína de haba a los tres tiempos de DGIS (0, 2 y 4 h). Tanto al inicio como después de la acción de la pepsina, se puede apreciar una amplia distribución de pesos moleculares, desde 15 hasta 250 kDa. Después del proceso de DGIS y por acción de la pancreatina se observa una reducción en los pesos moleculares, observándose únicamente bandas entre 10 y 15 kDa.

De los perfiles de pesos moleculares, tanto del aislado de proteína de alberjón como de haba, se puede destacar que al tratarse de proteínas sin tratamiento previo de hidrólisis, se observa un rango mayor de pesos moleculares que en los hidrolizados de estas leguminosas. El efecto de la pancreatina sobre la reducción del peso molecular fue mas observable en el aislado de haba que en el de alberjon.

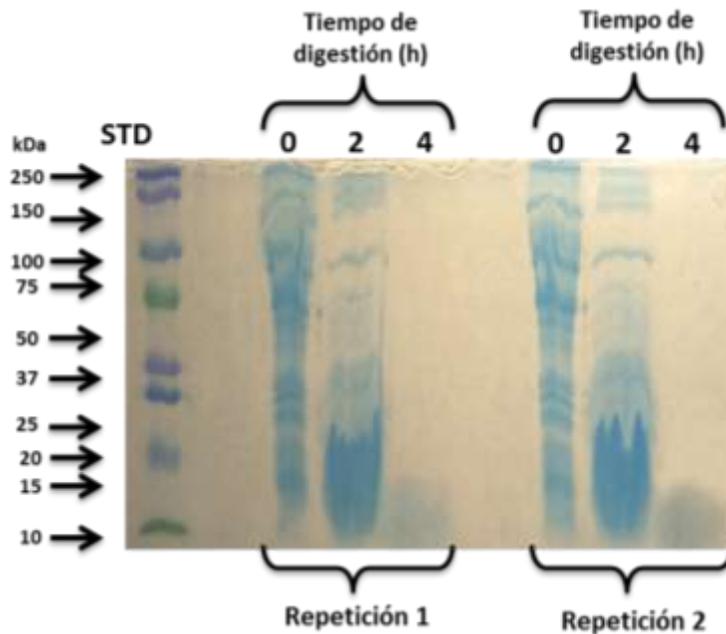


Figura 8. Distribución de pesos moleculares del aislado de proteína de haba, a diferentes tiempos de digestión gastrointestinal simulada.

Chen & Li (2012) estudiaron péptidos derivados de caseína y los sometieron a una digestión gastrointestinal simulada, observando que los péptidos tienden a hidrolizarse en mayor proporción dentro del intestino delgado y aquellos con un tamaño alrededor de 3 kDa son más susceptibles a ser hidrolizados durante la digestión. Para el caso de los perfiles realizados en este trabajo, se observan distribuciones de pesos moleculares alrededor de los 10 kDa.

Jimsheena & Gowda (2011) sometieron péptidos de cacahuate a una digestión gastrointestinal simulada y posteriormente observaron una distribución de pesos moleculares predominantemente menores a 50 kDa lo cual coincide con la distribución de pesos moleculares encontrados en todos los hidrolizados que se sometieron a la DGIS en este trabajo.

Boutrou *et al.* (2013) observaron que después de la digestión humana de la caseína, péptidos de tamaño medio, entre 1050 - 1800 kDa fueron liberados a las 3 h, mientras que péptidos entre 750 - 1050 kDa fueron liberados después de 6 h. La  $\beta$ -caseína fue el precursor más importante de péptidos, incluyendo biopéptidos con actividades opioides y antihipertensivas. El comportamiento de los hidrolizados estudiados, en cuanto a la reducción de tamaños a medida que aumenta el grado de hidrólisis, coincide con lo encontrado por este autor, pero los tamaños encontrados en este trabajo son menores (10 - 250 kDa).

Cian, Vioque & Drago (2015) obtuvieron extractos de hidrolizado de gluten de trigo con una proteasa alcalina (Protex 6 L) y determinaron el perfil de pesos moleculares, obteniendo tamaños inferiores a 14.4 kDa, lo que indica una hidrólisis efectiva de las proteínas del gluten mediante el proceso de hidrólisis enzimática. Los valores de pesos finales obtenidos son muy cercanos a los que se obtuvieron en todos los hidrolizados al término de la DGIS (cerca de 10 kDa).

Saadi, Saari, Anwar, Hamid & Mohd (2015) indican que al usar diferentes tipos de enzimas proteolíticas, tales como la pepsina, tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, Alcalasa<sup>®</sup>, papaína, proteasa XXIII, Corolasa PP<sup>®</sup> y neutrasa, su acción catalítica es diferente entre las enzimas debido a la especificidad enzima - sustrato. Como resultado se generan amplias variedades de fragmentos activos en el medio de reacción. Lo anterior explica el hecho de tener diferentes perfiles de pesos, ya que aunque se aplicaron las mismas enzimas, éstas también actúan de manera diferente dependiendo del sustrato usado.

### 4.3 Actividad antioxidante

La Figura 9 presenta la actividad antioxidante expresada como IC<sub>50</sub> (mg/mL). Esta actividad se determinó antes y después del proceso de digestión simulada (0 y 4 h). En los aislados de proteína de ambas leguminosas no se detectó actividad antioxidante antes de la digestión, pero si la presentaron al término de esta. Esto es probablemente debido a que antes de la hidrólisis digestiva, los péptidos con actividad antioxidante se encontraban encriptados dentro de las cadenas de proteínas.

En cuanto a los hidrolizados de haba, no presentaron cambios significativos debido al proceso de digestión, lo que indica que los péptidos con actividad antioxidante, determinados antes de la digestión, fueron resistentes a esta. Lo mismo ocurre con el hidrolizado de AE. Sin embargo AF si presenta una reducción significativa en su actividad antioxidante al final del proceso de digestión. La DGIS no tuvo efecto significativo sobre la actividad antioxidante de todos los hidrolizados, exceptuando AF y los aislados de proteína (APA y APH) al final de la digestión.

Cuadro 1. Efecto de la digestión gastrointestinal simulada sobre la actividad antioxidante de hidrolizados y aislados de proteína.

Muestra	IC <sub>50</sub> (mg/mL) 0 h	IC <sub>50</sub> (mg/mL) 4 h
AE	7.39 ± 1.09 b	4.76 ± 0.07 b
AF	10.48 ± 1.10 b	40.84 ± 6.21 a
HE	6.12 ± 0.59 b	5.49 ± 0.04 b
HF	8.07 ± 0.42 b	11.66 ± 2.04 b
APA	No detectado	3.43 ± 0.05 b
APH	No detectado	0.72 ± 0.09 b

Chan, Bo, Bo & Ningning (2015) estudiaron los cambios en la actividad antioxidante de péptidos sometidos a una digestión gastrointestinal simulada, usando pepsina y pancreatina. Encontraron que durante las primeras 2 h, no había cambios significativos en dicha actividad, sin embargo, durante las últimas 2 h de digestión, la actividad antioxidante se incrementaba significativamente siendo incluso mayor a la que se tenía previo al proceso de digestión. Lo anterior se atribuyó a la exposición de los aminoácidos metionina y cisteína por acción de la pancreatina. A diferencia de este autor, la mayoría de los hidrolizados mantuvieron la misma actividad antioxidante al término de la DGIS.

Yan, Huang, Sun, Jiang & Wu (2015) obtuvieron hidrolizados de proteína de arroz y reportaron que pesos moleculares por debajo de 3 kDa exhibieron la mayor actividad antioxidante usando el ensayo del radical DPPH ( $IC_{50} = 3.53$  mg/mL). Los valores de  $IC_{50}$  obtenidos en este trabajo son mayores debido a que los pesos moleculares al término de la DGIS son mayores a lo reportado por este autor.

Durak, Baraniak, Jakubczyk & Swieca (2013) obtuvieron péptidos de fracciones de proteína de semillas de frijol adzuki por medio de una DGIS obteniendo un valor de  $IC_{50} = 0.38$  mg/mL para la prueba de DPPH en extracto crudo. La actividad antioxidante tan alta reportada por este autor, en comparación con lo encontrado, es posiblemente debido a que el uso de fracciones específicas de proteína tiende a aumentar las actividades biológicas tales como la antioxidante.

Chen *et al.* (2012) estudiaron péptidos derivados de caseína sometidos a una digestión gastrointestinal simulada, observando que los péptidos con tamaño menor a 1 kDa presentaron mayor actividad antioxidante al final del proceso. Para los péptidos estudiados, el hecho de que no se haya encontrado diferencias en la actividad antioxidante se debe a que los tamaños moleculares obtenidos no son tan bajos.

Como se ha descrito antes, cada muestra reaccionó de manera diferente ante la acción de pepsina y pancreatina ya que la actividad antioxidante de los péptidos depende no solamente de su peso molecular, sino de otros factores como la composición y secuencia de aminoácidos, así como la configuración estructural de los péptidos (Ketnawa *et al.*, 2015). Adicionalmente, otra posible explicación relacionada al poder antioxidante de los péptidos es la presencia de residuos hidrofóbicos como la Gly, Pro, Ala, Val y Leu.

Kasase, Ganeshalingam & Howell (2008) hidrolizaron proteínas de soya con pepsina y pancreatina, y determinaron su capacidad antioxidante. La fracción con pesos moleculares más elevados (5 - 10 kDa), dio lugar a una menor actividad antioxidante que la fracción con menor peso molecular (0 - 5 kDa). Lo anterior confirma una vez más que al disminuirse los pesos moleculares, la actividad antioxidante tiende a subir, sin embargo, para los hidrolizados de este trabajo, el hecho de que en la mayoría no haya habido cambios es posiblemente a que los pesos obtenidos no fueron tan bajos.

Ketnawa *et al.* (2015) produjeron hidrolizados a partir de piel de pescado, usando tripsina comercial y proteasas alcalinas viscerales. Estos fueron sometidos a una digestión gastrointestinal *in vitro*, los hidrolizados mostraron un incremento significativo en su actividad antioxidante con un tamaño de 2.2 kDa para los hidrolizados obtenidos con tripsina y 1.75 kDa para los hidrolizados obtenidos con proteasas alcalinas viscerales. Nuevamente se evidencia que los pesos obtenidos por este autor son la justificación de que exista un aumento en la actividad antioxidante de sus hidrolizados, a diferencia de los de este trabajo en la que los pesos después de la digestión oscilan en 10 kDa.

Aunado a lo anterior, diversas investigaciones han estudiado proteínas de leguminosas, tales como Yang, Yang, Chen & Cheng (2008) quienes evidenciaron la capacidad antioxidante *in vivo* del hidrolizado de proteína de soya con pepsina. Otra leguminosa que ha sido investigada por sus propiedades antioxidantes es el caupí (*Vigna unguiculata*) (Segura, Chel &

Betancur, 2010). Los autores observaron actividad antioxidante *in vitro*, en hidrolizado de caupí con Alcalasa<sup>®</sup>, Flavourzyme<sup>®</sup> y pepsina-pancreatina.

#### 4.4 Actividad antihipertensiva

Los resultados que se presentan a continuación corresponden a las 0 y 4 h de digestión, es decir, antes y después de la exposición de los péptidos a pepsina y pancreatina. El Cuadro 2 presenta los valores de IC<sub>50</sub> de cada muestra analizada, los cuales se refieren a la concentración requerida de péptidos para inhibir al 50 % la actividad de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I). Después del análisis estadístico, se observó que la DGIS no tuvo efecto sobre la actividad antihipertensiva de los péptidos de alberjón obtenidos con Flavourzyme<sup>®</sup> ni con fermentación en medio sólido. Seguido, se observó que los hidrolizados de haba obtenidos con Flavourzyme<sup>®</sup> y con fermentación en medio sólido, que antes del proceso de digestión no presentaban actividad antihipertensiva, después de dicho proceso sí la presentaron, con valores de IC<sub>50</sub> de 8.66 y 8.93 mg/mL respectivamente. Para el caso de los aislados de proteína de alberjón y haba, no se detectó actividad inhibitoria ACE-1 antes ni después del proceso de digestión.

Cuadro 2. Efecto de la digestión gastrointestinal simulada sobre la actividad antihipertensiva de hidrolizados y aislados de proteína.

Muestra	IC <sub>50</sub> (mg/mL) 0 h	IC <sub>50</sub> (mg/mL) 4 h
AE	2.39 ± 0.10 a	7.36 ± 1.32 a
AF	14.08 ± 2.21 a	8.52 ± 5.2 a
HE	No detectado	8.66 ± 4.98 a
HF	No detectado	8.93 ± 0.01 a
APA	No detectado	No detectado
APH	No detectado	No detectado

Lo anterior se atribuye a que al no haber tenido un tratamiento de hidrólisis previo, las cadenas de proteínas contenidas en los aislados fueron demasiado grandes para que la pepsina y pancreatina los hidrolizaran hasta un nivel en que se liberaran péptidos con actividad antihipertensiva. Los valores encontrados en este trabajo están dentro del rango de actividad antihipertensiva según Li, Le, Liu & Shi (2005) quienes reportan que la mayoría de los hidrolizados y péptidos enzimáticos tienen valores entre 0.20 y 246.7 mg/mL.

Para lograr obtener una hidrólisis más efectiva, posiblemente sea necesario usar una combinación de enzimas proteolíticas. Como ejemplo a esto, Chaves *et al.* (2014) estudiaron el efecto de cultivos microbianos combinados sobre la liberación de péptidos inhibidores de la ECA-I durante la producción de leche fermentada. Los resultados indicaron que la combinación de diferentes cultivos puede aumentar significativamente los niveles de péptidos antihipertensivos. La combinación más eficaz para producir estos péptidos fue una mezcla de *P. kudriavzevii* KL84A, *Lb. Plantarum* LAT3 y *E. faecalis* KL06, que tenía una IC<sub>50</sub> para la inhibición de ECA-I de 30.63 µg/mL. Comparado con lo obtenido en este trabajo, se pone en evidencia la efectividad de combinar cultivos para la obtención de péptidos con alta actividad antihipertensiva.

Por otra parte, los valores de IC<sub>50</sub> encontrados no son tan bajos, posiblemente debido a que en el hidrolizado se tiene una mezcla de péptidos cuya interacción podría disminuir su actividad general. Mao, Ni, Sun, Hao & Fan (2007) sometieron la caseína de leche Yak (*Bos grunniens*) bajo la acción de Alcalasa<sup>®</sup> y los resultados dieron dos nuevos péptidos inhibidores de la ECA-I Pro-Pro-Glu-Ile-Asn (PPEIN) (κ-CN, 156-160) con IC<sub>50</sub> = 0.29 ± 0.01 mg/mL y Pro-Leu-Pro-Leu-Leu (PLPLL) (β-CN; f136-140) con IC<sub>50</sub> = 0.25 ± 0.01 mg/mL. Por otro lado, Jiang, Tiang, Brodkorb & Huo (2010) aislaron dos nuevos péptidos inhibidores de ECA-I Arg-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly (κ-caseína; 25-30) con un IC<sub>50</sub> = 54 ± 1.2 µg/mL y Asp-Glu-Arg-Phe (κ-Caseína; 15-18) con IC<sub>50</sub> = 21 ± 0.8 µg/mL. Los trabajos anteriores ilustran de sobre manera que la purificación y

aislado de secuencias peptídicas tienen mayores actividades antihipertensivas que las obtenidas de una mezcla de péptidos provenientes de un hidrolizado, como fue el caso de este trabajo.

Otro ejemplo de lo anterior lo reportan Luna *et al.* (2015), quienes utilizaron diversas enzimas y tratamientos para obtener hidrolizados de la proteína del haba común con poder inhibitor de la ECA-I. La actividad inhibitoria varió ampliamente entre 0.001 µg/mL y 6.5 mg/mL. Se reporta que los hidrolizados de proteínas de frijol inhiben ECA-I con valores de IC<sub>50</sub> de 4.5 mg/mL (Betancur *et al.*, 2014). Por ultrafiltración fue posible obtener fracciones inferiores a 1 kDa a partir de hidrolizados de granos de difícil cocción con valores de IC<sub>50</sub> de 0.001 µg/mL (Ruiz, Dávila, Chel & Betancur, 2011). Los resultados reportados por Betancur *et al.* (2014) son similares a los obtenidos en este trabajo, pero como se ha mencionado antes, después de realizar una separación por ultrafiltración, esta actividad se incrementó.

En comparación al comportamiento de los aislados de proteína, Chen *et al.* (2007) obtuvieron que una hidrólisis previa de la leche fresca con Prozyme 6 presentó un impacto positivo en la actividad inhibitoria ECA-I de los péptidos, en la que el valor de IC<sub>50</sub> para el procedimiento combinado fue de 0,24 mg/mL, en contraste con 0.64 mg/mL para la fermentación directa y 1.18 mg/mL para la leche fresca. Esta mejora en la actividad antihipertensiva es comparable a los hidrolizados que antes de la digestión no presentaron inhibición ECA-I pero después de esta sí la presentaron.

En otros estudios, los hidrolizados de proteínas de plantas generados durante la digestión de la pepsina tienen mejores actividades inhibitorias ECA-I que aquella que tuvieron una segunda digestión con pancreatina, lo que sugiere que los péptidos inhibidores generados por la pepsina fueron hidrolizados durante la digestión con pancreatina (Guang & Phillips, 2009). Lo anterior puede explicar el caso de AE y AF, donde después de la digestión, la actividad antihipertensiva se mantuvo igual.

De igual manera, hidrolizados de germen de maíz con GC 106 (una proteasa ácida de *Aspergillus niger* y comercializada por Genencor Co.) mostraron mayor actividad inhibitoria ECA-I que los obtenidos por tripsina y termolisina, mientras que el tratamiento con Flavourzyme® no pudo mejorar la actividad de esta proteína de germen de maíz (Parris, Moreau, Johnston, Dickey & Aluko, 2008). Esto muestra como al igual que AE y AF el uso de Flavourzyme® no produjo cambios significativos sobre el hidrolizado estudiado.

Miguel *et al.* (2007) reportan que para hidrolizados de proteína de huevo blanco, la actividad antihipertensiva se mantiene después de la digestión cuando los péptidos tienen tamaños moleculares menores a 3 kDa. Las distribuciones de pesos obtenidas para todos péptidos se encuentran en un rango de 10 a 50 kDa, lo que explica que estos aún sufran cambios en su peso molecular durante la DGI.

Esta bioactividad parece estar influenciada fuertemente por la secuencia del tripéptido C-terminal. En la mayoría de los casos, se evidencia que los dipéptidos son inhibidores más potentes que los tripéptidos que son resistentes a la acción de las endopeptidasas del tracto digestivo. Algunos péptidos inhibidores de la ECA-I potentes derivados de alimentos contienen un residuo de prolina en el extremo C-terminal mientras que otros contienen residuos de lisina o arginina. Esto sugiere la presencia de un residuo con carga positiva contribuye a la potencia del inhibidor (Murray & FitzGerald, 2007). Para el caso de los hidrolizados de alberjón, la presencia de prolina, según lo reportado por Pastor *et al.* (2009), pudo ser un factor que influyó en la resistencia de su actividad antihipertensiva ante la DGIS.

En comparación con otros hidrolizados de leguminosas, los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos en este trabajo son mayores a lo reportado para hidrolizados de leguminosa de garbanzo (0.18 mg/mL) (Yust *et al.*, 2003); para proteína total de garbanzo (1.36 mg/mL) (Vermeirssen, Van Camp & Verstraete, 2002); y para la proteína del frijol mungo (0.64 mg/mL) (Li *et al.*, 2005). Estas diferencias son

debidas a que conformación del péptido, la cual contribuye a la actividad inhibitoria ya que la especificidad del sustrato difiere entre dos sitios activos de la ECA-I, péptidos hidrofóbicos tienen un enlace superior al sitio catalítico N-terminal, mientras que los péptidos hidrofílicos solo enlazan con el sitio catalítico C-terminal (Vermeirssen *et al.*, 2004; Shahidi & Zhong, 2008).

Cabe mencionar que dentro de este conjunto de estudios, los péptidos que muestran resistencia ante las enzimas gastrointestinales (pepsina, tripsina, quimotripsina) son los que tienen mejores perspectivas a ser ensayados *in vivo*. Por ejemplo, en hidrolizados de frijol, la mayor actividad inhibidora de la ECA-I se observó utilizando hidrólisis secuencial con pepsina-pancreatina, un hecho potencialmente importante ya que la pepsina es la principal enzima proteolítica generada en el estómago durante la digestión de los alimentos y la pancreatina incluye proteasas como tripsina, quimotripsina y elastasa, todas liberadas por el páncreas en el intestino delgado (Chel, Domínguez, Martínez, Dávila & Betancur, 2012).

## 5 CONCLUSIONES

Los péptidos de AE presentan un incremento significativo en el grado de hidrólisis después del proceso de digestión. La digestión no tuvo un efecto significativo sobre el grado de hidrólisis de los péptidos de AF. Para los péptidos de HE y HF se dio un incremento significativo del grado de hidrólisis después del proceso de digestión. Los aislados de proteína de alberjón y haba mostraron un aumento significativo en el grado de hidrólisis debido al proceso de digestión.

Durante el proceso de DGIS se incrementa gradualmente la distribución de bandas que corresponden a un peso molecular aparente entre 50 y 10 kDa para los cuatro hidrolizados. La distribución de pesos moleculares a partir de las 4 h de digestión tiende a reducirse a pesos moleculares por debajo de 15 kDa, como resultado de la acción de las enzimas pepsina y pancreatina. Para el caso de los aislados tanto de alberjón como haba, presentaron una distribución de pesos más amplia, abarcando desde 10 hasta 250 kDa. Al término de la digestión el aislado de alberjón descendió a pesos entre 10 y 50 kDa mientras que el aislado de haba a 15 kDa.

En los aislados de proteína de ambas leguminosas no se detectó actividad antioxidante antes de la digestión, pero si la presentaron al término de esta. Los hidrolizados de haba no presentaron cambios significativos debido al proceso de digestión. Lo mismo ocurre con el hidrolizado de AE. La DGIS redujo significativamente la actividad antioxidante de AF. La actividad antioxidante fue igual para todos los hidrolizados exceptuando el hidrolizado AF y aislados al final de la digestión.

La DGIS no tuvo efecto sobre la actividad antihipertensiva de los péptidos de alberjón obtenidos por ambas vías. Los hidrolizados de haba (obtenidos con Flavourzyme® y con fermentación en medio sólido) que antes del proceso de digestión no presentaban actividad antihipertensiva, después de dicho proceso la presentaron con valores de IC<sub>50</sub> de 8.66 y 8.93 mg/mL respectivamente. Para el caso de los aislados de proteína de alberjón y haba, no se detectó actividad antihipertensiva antes ni después del proceso de digestión.

Para la actividad antioxidante los péptidos de AF son los que mostraron un descenso en su actividad, por lo que se sugiere preservarlos por medio un sistema de protección y liberación controlada.

## 6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 1256-1262.
- Alemán A., Giménez B., Pérez-Santin E., Gómez-Guillén M.C., Montero P. (2011). Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chem* 125: 334–41.
- Alsohaimy, S. A., Sitohy, M. Z., & El-Masry, R. A. (2007). Isolation and partial characterization of chickpea, lupine and lentil seed proteins. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3, 123-129.
- Antal J., Pal G., Asboth B., Buzas Z., Patthy A., Graf L. (2001). Specificity assay of serine proteinases by reverse phase high performance liquid chromatography analysis of competing oligopeptide substrate library. *Anal Biochem* 288:156–167
- Betancur-Ancona, D., Sosa-Espinoza, T., Ruiz-Ruiz, J., Segura-Campos, M., & Chel Guerrero, L. (2014). Enzymatic hydrolysis of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates and its effects on biological and functional properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 2–8.
- Boutrou, R., Gaudichon, C., Dupont, D., Jardin, J., Airinei, G., Marsset-Baglieri, A., . . . Leonil, J. (2013). Sequential release of milk protein-derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans. *Am J Clin Nutr*, 97(6), 1314-1323. doi: 10.3945/ajcn.112.055202
- Boutrou, R., Gwénaële H., & Sanchez-Rivera, L. (2015). On the trail of milk bioactive peptides in human and animal intestinal tracts during digestion: A review. *Dairy Science & Technology*, 95(6), 815-829. doi: 10.1007/s13594-015-0210-0
- Bu, G. H., Li, H. J., & Yang, G. Y. (2005). The property and application of antibacterial peptides. *Prog Vet Med*, 26(3), 26-28.C.
- Byun H. & Kim S. (2001). Purification and Characterization of Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) Skin. *Journal of Process Biochemistry*, Vol. 36, No. 12 pp. 1155-1162. doi:10.1016/S0032-9592(00)00297-1

Capriotti A.L., Caruso G., Cavaliere C., Samperi R., Ventura S., Zenezini C.R., Lagana A. (2015). Identification of potential bioactive peptides generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 205–213.

Carrillo G., Candia M., Lugo R., Espinoza E., Noriega J. (2013). Evaluación de procedimientos de tinción para el análisis de proteínas por electroforesis (SDS-PAGE). *INVURNUS* Vol 8 No. 1, 19-26

Cian, R. E., Vioque, J., & Drago, S. R. (2015). Structure–mechanism relationship of antioxidant and ACE I inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate fractionated by pH. *Food Research International*, 69, 216-223. doi: 10.1016/j.foodres.2014.12.036

Coda, R.; Rizzello, C.G.; Pinto, D.; Gobbetti, M. (2012). Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Appl. Environ. Microbiol*, 78, 1087–1096.

Cooper, W. O.; Hernandez-Diaz, S.; Arbogast, P. G.; Dudley, J. A. (2006). Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors. *New Engl. J. Med.* 354, 2443–2453.

Chaves-López, C., Serio, A., Paparella, A., Martuscelli, M., Corsetti, A., Tofalo, R., et al. (2014). Impact of microbial cultures on proteolysis and release of bioactive peptides in fermented milk. *Food Microbiology*, 42, 117–121.

Chan W., Bo L., Bo W., Ningning X. (2015). Degradation and antioxidant activities of peptides and zinc–peptide complexes during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry* 173, 733–740.

Chel-Guerrero, L., Pérez-Flores, V., Betancur-Ancona, D., Dávila-Ortíz, G. (2002). Functional Properties of Flours and Protein Isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 5, pp. 584-591. doi:10.1021/jf010778j.

Chel-Guerrero, L., Domínguez-Magaña, M., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortiz, G. Betancur-Ancona, S. (2012). Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) Protein Hydrolysates with ACE-I Inhibitory Activity. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 511-521.

Chen HM., Muramoto K., Yamauchi F. (1998). Antioxidative properties of histidinecontaining peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* 46:49–53

Chen, Min, & Li, Bo. (2012). The effect of molecular weights on the survivability of casein-derived antioxidant peptides after the simulated gastrointestinal digestion. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 341-348.

Chen, G., Tsai, J., & Pan, B. (2007). Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *International Dairy Journal*, 17,641–647.

Cushman, D.W., & Cheung, H.S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20, 637–1648.

Daniel, H. (2004). Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annual Review of Physiology*, 66(1), 361–384.

Durak, A., Baraniak, B., Jakubczyk, A., & Swieca, M. (2013). Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. *Food Chem*, 141(3), 2177-2183. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.05.012

Dziuba, J. & Darewicz M. (2007). Food proteins as precursors of bioactive peptides - classification into families. *Food Sci. Technol. Int.* 404.

Ekmekcioglu C. (2002). A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chem*, 76:225–30.

Erdmann K., Cheung B., Schröder. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 643–654.

Farvin K., Baron C., Nielsen N., Jacobsen C. (2010). Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 1-in vitro assays and evaluation in  $\omega$ -3 enriched milk. *Food Chem*. 123:1081–9.

Fitzgerald R., Murray B. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *Int J Dairy Technol.* 59:118-125.

FitzGerald, R.J., Meisel, H. (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *Br. J. Nutr.* 84, S33–S37.

Garcia, 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. doi: 10.1016/j.talanta.2012.12.041

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins MR., Appel RD., Baioch A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM (ed) *The proteomics protocols handbook*. Humana Press

Guang C. & Phillips R. D. (2009). Plant Food-Derived Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides. *J. Agric. Food Chem.* 57, 5113–5120.

Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L., & Dary-Mourot, A. (2014). Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Research International*, 63, 71–80.

Halliwell, B. & Whiteman M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean. *Brit. J. Pharmacol.* 142: 231-55.

Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol*, 18(2), 163-169. doi: 10.1016/j.copbio.2007.01.013

Hong, F., L. Ming, S. Yi, L. Zhanxia, W. Yongquan & L. Chi. (2008). The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs, *Peptides* 29: 1062-71.

Irshad, I., Kanekanian, A., Peters, A., & Masud, T. (2013). Antioxidant activity of bioactive peptides derived from bovine casein hydrolysate fractions. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 231-239. doi: 10.1007/s13197-012-0920-8.

Jiang, Z., Tian, B., Brodkorb, A., Huo, G. (2010). Production, analysis and in vivo evaluation of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from bovine casein. *Food Chem.* 123: 779–86.

Jimsheena, V. K., & Gowda, Lalitha R. (2011). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from arachin by simulated gastric digestion. *Food Chemistry*, 125, 561-569.

Kasera, R., Singh, A. B., Lavasa, S., Prasad, K. N., & Arora, N. (2015). Enzymatic hydrolysis: a method in alleviating legume allergenicity. *Food Chem Toxicol*, 76, 54-60. doi: 10.1016/j.fct.2014.11.023.

Kasase, A. Ganeshalingam, N.K. Howell. (2008). Gums and stabilisers for the food industry *Hydrocolloids Health* 14, 402 - 406.

Ketnawa S., Martínez-Alvarez O., Benjakul S., Rawdkuen S. (2015). Gelatin hydrolysates from farmed Giant catfish skin using alkaline proteases and its antioxidative function of simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chemistry*, 192, 34–42.

Kitts, D.D. & Weiler K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery, *Curr. Pharm.Design* 9: 1309-23.

Korhonen, H. & Pihlanto-Leppälä A. (2003). Milk-Derived Bioactive Peptides: Formation and Prospects for Health Promotion En: *Handbook of Functional*

Dairy Products. Functional Foods and Nutraceuticals (C. Shortt & J. O'Brien Eds.), Series 6.0, Florida, CRC Press.

Kreil, G., Umbach, M., Brantl, V., Teschemacher, H. (1983). Studies of the enzymatic degradation of b-casomorphins. *Life Sci.* 33:137–140.

Kristinsson, H. & Rasco B. (2000). Biochemical and Functional Properties of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Proteins Hydrolyzed with Various Alkaline Proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 48, No. 3, pp. 657-666. doi:10.1021/jf990447v

Ktari, N., Nasri, R., Mnafigui, K., Hamden, K., Belguith, O., Boudaouara, T. (2014). Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from zebra blenny (*Salaria basilisca*) in alloxan-induced diabetic rats. *Process Biochemistry*, 49, 890–897

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structure proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Lecomte, N., Zayas, J., & Kastner, C. (1993). Soy proteins functional and sensory characteristics improved in comminuted meals. *Journal of Food Science*, Vol. 58, No. 3, pp. 464-466. doi:10.1111/j.1365-2621.1993.tb04300.x

Li, H. & Aluko, R.E. (2010). Identification and inhibitory properties of multifunctional peptides from pea protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 58, 11471–11476.

Li, G. H., Le, G. W., Liu, H., Shi, Y. H. (2005). Mung-bean Protein Hydrolysates Obtained with Alcalase Exhibit Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity. *Food Science and Technology International*, Vol. 11, No. 4, pp. 281-287. doi:10.1177/1082013205056781

Lisboa, C., Pereira, A., Ferreira, S., Jorge, A. (2014). Utilisation of *Spirulina* sp. and *Chlorella pyrenoidosa* biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. *Int J Eng Res Appl* 4:29-38.

Luna-Vital, D., Mojica, L., González de Mejía, E., Mendoza, S., Loarca-Piña G. (2015). Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Research International*, 76, 39–50. doi: 10.1016/j.foodres.2014.11.024

Malaguti, M., Dinelli, G., Leoncini, E., Bregola, V., Bosi, S., Cicero, F.G., Hrelia, S. (2014). Bioactive peptides in cereals and legumes: Agronomical, biochemical and clinical aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 21120-21135.

Mao, X-Y, Ni, J-R, Sun, W-L, Hao, P-P, Fan, L. (2007). Value-added utilization of yak milk casein for the production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Chem.* 103:1282–7

Medina-Godoy, S., Ambriz-Pérez, D.L., Fuentes-Gutiérrez, C.I., Germán-Báez, L.J., Gutiérrez-Dorado, R., Reyes-Moreno, C., Valdez-Ortiz, A. (2012). Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and functional characterization of protein hydrolysates of hard-to-cook chickpeas. *J. Sci. Food Agric.* 92, 1974–1981.

Meisel, H. (1997). Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk protein. *Peptide Sci.* 43:119–128.

Meisel, H. (1998). Overview on milk-protein derived peptides, *Int. Dairy J.* 8: 363–73.

Meisel H. (2004). Multifunctional peptides encrypted in milk proteins, *Biofactors* 21: 55-61.

Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S.K. (2006). Antioxidant properties of a radical scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatine hydrolysate. *J Agric Food Chem* 53:581–587.

Miguel, M., Alonso, M., Salices, Mercedes, S., Aleixandre A., & López-Fandiño R. (2007). Antihypertensive, ACE-inhibitory and vasodilator properties of an egg white hydrolysate: Effect of a simulated intestinal digestion. *Food Chemistry*, 104, 163-168.

Mullaly, M.M., Meisel, H., Fitzgerald, R.J. (1997). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *Int. Dairy J.* 7, 299–303.

Murray, B.A. & R.J. FitzGerald. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production, *Curr. Pharm. Design* 13: 773-91.

Natesh, R., Schwager, S. L. U., Sturrock, E. D., Acharya, K. R. (2003). Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature*, 421, 551–554.

Oshodi, A. A. & Aletor, V. A. (1993). Functional Properties of Haemagglutinins (Lectins) Extracted from Some Edible Varieties of Lima Beans (*Phaseolus lunatus* L). *International Journal of Food Science and Nutrition*, Vol. 44, pp. 133-136. doi:10.3109/09637489309017431

Park, S. Y., B. F. Gibbs, and B. H. Lee. (1996). Identification of peptides derived from b-casein hydrolysates by proteolytic enzymes. *Korean J. Dairy Sci.* 18:237–246.

Parris, N.; Moreau, R. A.; Johnston, D. B.; Dickey, L. C.; Aluko, R. E. (2008). Angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptides from commercial wet- and dry-milled corn germ. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2620–2623.

Pastor E., Juan R., Pastor J., Alaiz M. & J. Vioque. (2009). Analytical nutritional characteristics of seed proteins in six wild *Lupinus* species from Southern Spain. *Food Chemistry* 117 466–469

Pedroche, J., Yust, M. M., Giron-Calle, J., Alaiz, M., Mill, F., Vioque, J. (2002). Utilization of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I- converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *J. Sci. Food Agric.* 82, 960–965.

Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et. al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83, 346-350.

Pihlanto-Lepälä, A. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides, *Trends Food Sci. Technol.* 11: 347-56.

Pryde, P. G., Sedman, A. B., Nugent, C. E., Barr, M. (1993). Angiotensin converting enzyme inhibitor fetopathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 3, 1575–1582.

Puchalska, P., Marina, M. L., García M. C. (2011). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* DOI: BFSN- 2011-0519.R1.

Ricci-Cabello, I., Herrera, M., & Artacho, R. (2012). *Nutrition Reviews*<sup>®</sup> Vol. 70(4): 241 255. doi:10.1111/j.1753-4887.2011.00448.x.

Rohrbach, M. S.; Williams, E. B.; Rolstad, R. A. (1981). Purification and substrate specificity of bovine angiotensin converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 256, 225–230.

Ruiz-Ruiz, J., Dávila-Ortíz, G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant peptide fractions from hard-to-cook bean enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, 37, 26–35.

Saadi, S., Saari, N., Anwar, F., Hamid, A. A., & Mohd Ghazali, H. (2015). Recent advances in food biopeptides: production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnol Adv*, 33 (1), 80-116. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.003.

Schlimme, E., H. Meisel, & H. Frister. (1988). Bioactive sequences in milk proteins. *Nutritional Clinical, Functional and Technological Aspects*. E. Schlimme, ed. New York, NY. pp 143–149.

Shahidi, F. & Zhong, Y. (2008). Bioactive peptides. *J. AOAC Int.* 91, 914–931.

- Sharma, S., & Kortas. C. (2004). Hypertension, e-medicine CME program: <http://emedicine.medscape.com/article/241381>- última consulta 20 Noviembre, 2016.
- Sharma, O.P., & Bhat, T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113,1202–1205.
- Segura, M.R., Chel, L.A., Betancur D.A. (2010). *J. Sci. Food Agric.* 90 2512.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82: 291 5.
- Soares de Castro, R.J., & Harumi, S. 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, 58–65.
- Suetsuna, K., Ukeda, H., Ochi, H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J Nutr Biochem.* 11:128 131.
- Torres-Fuentes, C., Contreras, M., Recio, I., Alaiz, M., Vioque, J. (2015). Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 180, 194 – 202.
- Van der Ven, C.; Gruppen, H.; de Bont, D. B. A.; Voragen, A. G. J. (2002). Optimization of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. *Int. Dairy J.* 12, 813–820.
- Vermeirssen, V., J. Van Camp & W. Verstraete. (2002). Optimization and Validation of an Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Assay for Screening of Bioactive Peptides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, Vol. 51, No. 1, pp. 75-87. doi:10.1016/S0165-022X(02)00006-4
- Vermeirssen, V., J. Van Camp & W. Verstraete. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides, *Brit. J Nutr.* 92: 357-366.
- Vioque, J., Alaiz, M., Girón-Calle, J. (2012). Nutritional and functional properties of *Vicia faba* protein isolates and related fractions. *Food Chemistry* 132 (2012) 67–72. doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.033.
- Wang, W., de Mejia, E.G. (2005). A new frontier in soy bioactive that may prevent age-related chronic diseases. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 4, 63–78.
- Willcox, J.K., Ash S.L., Catignani, G.L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Food Sci Nutr* 44:275–295.

Wu, J. & Ding, X. (2002). Characterization of inhibition and stability of soyprotein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res. Int.* 35, 367–375.

Yamamoto, N., A. Akino, and T. Takano. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 77:917–922.

Yan, Q. J., Huang, L. H., Sun, Q., Jiang, Z. Q., & Wu, X. (2015). Isolation, identification and synthesis of four novel antioxidant peptides from rice residue protein hydrolyzed by multiple proteases. *Food Chem*, 179, 290-295. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.01.137

Yang, Y., Yang, S.C., Chen, S.T., Cheng, J.R., J. (2008). *Nutr. Biochem.* 19, 833.

Yust, MM., Pedroche, J., Calle, JG., Alaiz, M., Millán, F., Vioque, J. (2003). Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chem* 81:363–9.

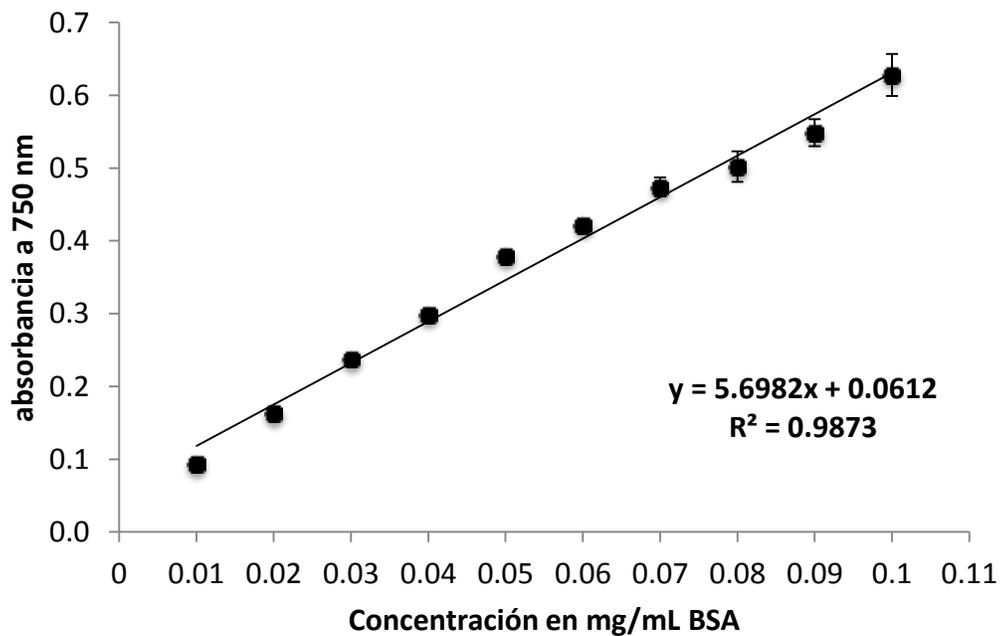
Zambrowicz, A., Timmer, M., Polanowski, A., Lubec, G., Trziszka, T. (2013). Manufacturing of peptides exhibiting biological activity. *Amino Acids*, 44, 315–320.

Zhou, Cunshan, Yu, Xiaojie, Qin, Xiaopei, Ma, Haile, Yagoub, Abu ElGasim A., & Hu, Jiali. (2016). Hydrolysis of rapeseed meal protein under simulated duodenum digestion: Kinetic modeling and antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 523-531. doi: 10.1016/j.lwt.2015.11.057

## 7 ANEXOS

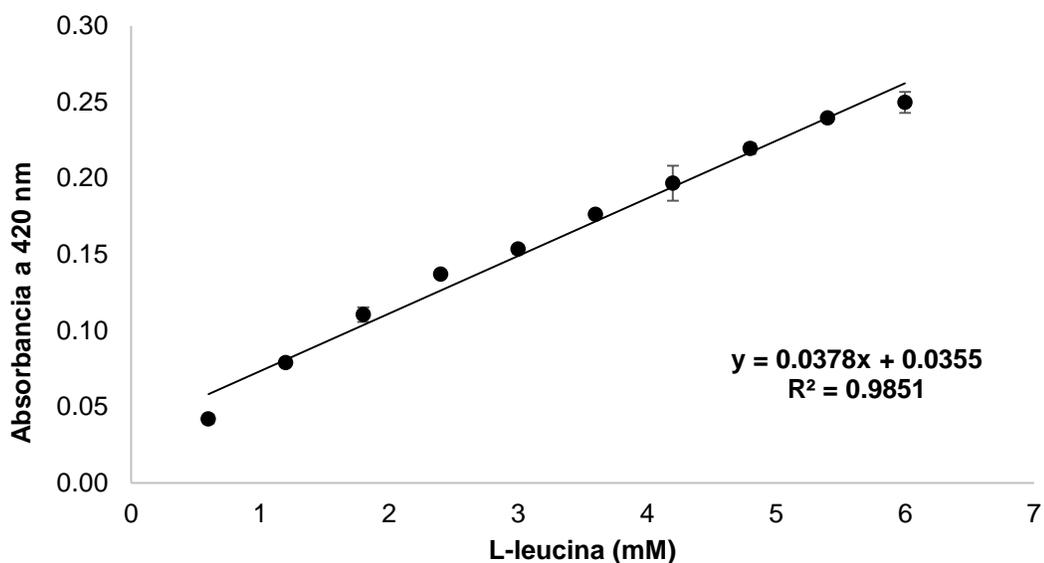
### **Curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA)**

Se preparó una curva estándar de BSA la cual se empleó para obtener una relación entre absorbancia y concentración de proteína (mg/mL). Para lo anterior, se prepararon las siguientes diluciones de BSA: 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 y 0.1 mg/mL. De cada dilución se tomó 1 mL y se aplicó la metodología descrita en el apartado 4.2 “Cuantificación de proteína” (pág \_).



**Curva estándar de L-leucina**

Se preparó una solución estándar de L-leucina 6 mM, a partir de la cual se prepararon las siguientes disoluciones seriales: 0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3, 3.6, 4.2, 4.8, 5.4 y 6 mM. A cada una de estas diluciones se aplicó la metodología para determinar el grado de hidrólisis descrita en el apartado "" (pág. \_) . Los resultados de absorbancia obtenidos vs. la concentración de L-leucina (mM) fueron graficados y finalmente se obtuvo un modelo matemático de regresión lineal.



### **Disoluciones empleadas en el ensayo de actividad antihipertensiva**

A partir de las alícuotas de la digestión gastrointestinal simulada y amortiguador de borato 0.1 M pH 8.3 con NaCl 0.3 M se hicieron diluciones para tener cinco concentraciones de péptidos: 3, 6, 9, 12 y 15 mg/mL. Para el tubo testigo se usó la concentración de 15 mg/mL de péptidos sin la adición de enzima. Se empleó la enzima convertidora de angiotensina (ECA-I) suspendida en glicerol 50 % (v/v). Posteriormente se prepararon las siguientes mezclas de reacción

Cuadro A1. Composición de las mezclas de reacción para determinación de actividad antihipertensiva

Muestra	Suspensión péptidos (μL)	Amortiguador borato pH 8.3 (μL)	ECA-I (2 mU) (μL)	Glicerol 50 % (v/v) (μL)
Control	0	100	100	0
Testigo	100	0	0	100
Blanco	0	100	0	100
3 mg/mL	100	0	100	0
6 mg/mL	100	0	100	0
9 mg/mL	100	0	100	0
12 mg/mL	100	0	100	0
15 mg/mL	100	0	100	0

### Distribución de pesos moleculares por electroforesis

Se prepararon los siguientes reactivos con las cantidades que se indican a continuación:

---

Acrilamida / Bis (30 % T, 2.26 % C) (100 mL)

- Acrilamida 29.2 g
  - N'N'- Bis-metil-acrilamida 0.8 g
- 

---

Disolución amortiguara (1.5 M) Tris - HCl pH 8.8

18.6 g/100 mL Tris base

Ajustar a pH 6.8 con HCl 6 N

---



---

Disolución amortiguara (0.5 M) Tris - HCl pH 6.8

6 g/Tris base 100 mL

Ajustar a pH 6.8 con HCl 6 N

---

---

Disolución amortiguara de corrida pH 8.3 (600 mL)

Tris base 9 g

Glicina 43.2 g

SDS 3 g

Diluir al 20 % (v/v) en agua desionizada

Duodecil sulfato de sodio (SDS)

SDS 10 % (v/v) en desionizada

---

---

Solución amortiguara muestra

Agua desionizada .....4 mL

Tris - HCl pH 6.8 (0.5 M)..... 1 mL

Glicerol .....0.8 mL

SDS 10 % (p/v) .....1.6 mL

2 $\beta$ -mercaptoetanol ..... 0.4 mL

Azul de bromofenol 0.05 % (p/v) ..... 0.2 mL

---

---

Solución teñidora

40 % Metanol - 10 % ácido acético - 50 % Agua desionizada

0.01 % Azul de comassie G - 250

---

---

Solución desteñidora

40 % metanol - 10 % ácido acético - 50 % Agua desionizada

---

## Preparación de geles

La preparación de geles se hizo con el equipo de electroforesis (Mini-Protean<sup>®</sup> 3 Bio-Rad) de la siguiente manera:

### Gel de separación 12 %

#### Reactivos

Agua desionizada [mL]	5.025
1.5 Tris-HCl pH 8.8 [mL]	3.75
SDS 10 % [ $\mu$ L]	150
Acrilamida/Bis [mL]	6
Persulfato de amonio (10 %) [ $\mu$ L]	75
TEMED [ $\mu$ L]	7.5

### Gel de Concentración

#### Reactivos

Agua desionizada [mL]	6.1
Tris-HCl pH 6.8 (0.5 M) [mL]	2.5
SDS 10 % (v/v) [ $\mu$ L]	100
Acrilamida/Bis [mL]	1.5
Persulfato de amonio 10 % (v/v)	60
TEMED [ $\mu$ L]	16

### Preparación de muestra

Se prepararon 50  $\mu$ L de cada alícuota dosificando 30  $\mu$ L de muestra y 20  $\mu$ L de amortiguador muestra, esta mezcla se colocó dentro de viales, se agitaron con vortex y posteriormente se mantuvieron a baño en ebullición por 5 min. Se inyectaron 15  $\mu$ L en cada pozo del gel.