

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUELANTE DE COBRE DE HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS DEL GRANO DE AMARANTO (*Amaranthus hypochondriacus*)

A. Becerril-Ramírez^a, F.M.H. Paredes-Ruiz^b, J. López-Sánchez^b y J. Soriano-Santos^{a*}.

^a Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. Av. Universidad 3000, Colonia del Carmen, Delegación Coyoacán. C.P. 04510, Ciudad de México, México. ^b Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Planta piloto No. 1, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa. C.P. 09340, Ciudad de México, México. *jss@xanum.uam.mx

RESUMEN:

El amaranto posee una de las proteínas con un alto valor biológico. Se ha comprobado que la actividad de péptidos de proteína de amaranto, obtenidos mediante hidrólisis enzimática tienen un efecto antioxidante, antihipertensivo, entre otros. Debido a ello, se evaluaron y caracterizaron los hidrolizados proteicos de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto, las condiciones de hidrólisis óptimas fueron T= 50°C, concentración de fracción proteica 2mg/ml, alcalasa 2.4 mUA/mL, pH 7.4, a tiempos de 3, 21, 30 y 36 horas. Se obtuvieron perfiles de elusión para cada tratamiento mediante cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G15, 220 nm), y se guardaron las fracciones obtenidas. Se evaluó el grado de hidrólisis de cada tratamiento para cada proteína y se determinó un grado de hidrólisis mayor a un tiempo de hidrólisis a 36 horas para ambas fracciones proteicas con un porcentaje de hidrólisis de 22 y 17 para albúmina 1 y globulina, respectivamente. Además se midió la actividad quelante de cobre para cada hidrolizado y se encontró un porcentaje de quelación similar para los hidrolizados a 36 horas, obteniendo un valor del 78% y 77% para albúmina y globulina respectivamente, no se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$).

ABSTRACT:

Amaranth has one of the proteins with a high biological value. It has been found that the activity of amaranth protein peptides obtained by enzymatic hydrolysis with an antioxidant, antihypertensive effect, among others. Because of this, were assessed and characterized protein hydrolysates albumin 1 and globulin grain amaranth, the optimum conditions of hydrolysis were T = 50 ° C, concentration of protein fraction 2mg / ml Alcalase 2.4 mAU / mL, pH 7.4, at times: 3, 21, 30 and 36 hours. elution profiles for each treatment were obtained by size exclusion chromatography (Sephadex G15, 220 nm), and the fractions obtained were stored. the degree of hydrolysis of each treatment for each protein was evaluated and a higher degree of hydrolysis was determined at a hydrolysis time to 36 hours for both protein fractions with a percentage of hydrolysis of 22 and 17 Albumin 1 and globulin, respectively. In addition, the chelating activity of copper for each hydrolyzate was measured and a percentage similar chelation hydrolysates to 36 hours was found, obtaining a value of 78% and 77% for albumin and globulin respectively, no significant difference ($p < 0.05$ was found).

Palabras clave: Amaranto, albúmina y globulina, actividad quelante de cobre.

Keywords: Amaranth, albumin and globulin, copper chelating ability.

Área: Cereales, leguminosas y oleaginosas

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente el consumo de proteínas en la dieta se realizaba para cubrir los requerimientos de aminoácidos esenciales, sin embargo la importancia y aplicación de estas en diferentes campos de la ciencia ha demostrado beneficios a la salud del consumidor. Estudios recientes han demostrado que las proteínas y los péptidos derivados de ellas, exhiben una serie de actividades biológicas con efecto directo sobre procesos fisiológicos del organismo, más allá de su aporte nutrimental (Iwaniak y Minikiewicz, 2007).

Recientemente se ha descrito la presencia de algunos fitoquímicos y proteínas con actividad biológica en la semilla de amaranto (*Amaranthus spp*). El valor nutritivo y contenido proteico (entre 13% y 16%), así como el balance adecuado de aminoácidos esenciales principalmente lisina, metionina y triptófano; aminoácidos que son deficientes en los demás cereales, ha llevado a asociar su consumo para la prevención de problemas cardiovasculares, de diversos tipos de cáncer, de colesterol alto, antihipertensivo, entre otras (Contreras y col., 2010).

El consumo de amaranto se limita en alimentos artesanales como dulces, sin embargo se puede aprovechar más y de una mejor manera los principales nutrimentos y compuestos con actividad biológica para diversificar el consumo del mismo, además de presentar alternativas tecnológicas que contribuyan con alto aporte nutritivo y de buena aceptabilidad. Por otra parte, el amaranto puede ser una alternativa para el control y tratamiento y algunas condiciones médicas, como síndrome metabólico que actualmente afecta a la población mexicana.

El objetivo del presente trabajo es evaluar y caracterizar los hidrolizados proteicos de *Amaranthus hypocondriacus* para determinar la actividad quelante de cobre que está relacionada con la actividad antioxidante. El presente trabajo aborda la caracterización de las proteínas albúmina 1 y globulina del grano de amaranto, mediante una hidrólisis controlada con alcalasa a 4 diferentes tiempos (3, 21, 30 y 36 horas). Mediante cromatografía de filtración en gel se realizó un perfil de elusión de los hidrolizados de cada proteína, obteniendo así bandas de respuesta a diferentes fracciones proteicas que fueron separadas por la columna. Se determinó el grado de hidrólisis para cada tratamiento encontrándose que a un mayor grado de hidrólisis se tiene un mayor número de α -amino libre, las condiciones de máximo grado de hidrólisis se evaluó a 36 horas para los hidrolizados de las dos proteínas. Además se determinó la actividad quelante de cobre en cada hidrolizado y se obtuvo que cuanto mayor sea el grado de hidrólisis mejor actividad de quelación hacia el ión Cu^{2+} , lo que resulta de relevancia ya que existe una relación con la actividad antioxidante de dichos péptidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de la molienda y tamizado del grano de amaranto se obtiene la harina, de la cual se extrajeron las proteínas de interés albúmina 1 y globulina mediante una solución de Na_2SO_4 al 5% (Padhye y Salunke, 1977). Posteriormente se ajusta la

concentración de las proteínas a 2mg/ml mediante el método de Bradford; se inicia la hidrólisis controlada con alcalasa, ajustando la actividad de la enzima a 2.4mUA/mL, con una relación E/S = 0.8 UA/g, pH = 7.4, T= 50°C y t= 3, 21, 30 y 36. La reacción se detiene con inhibidor PMSF.

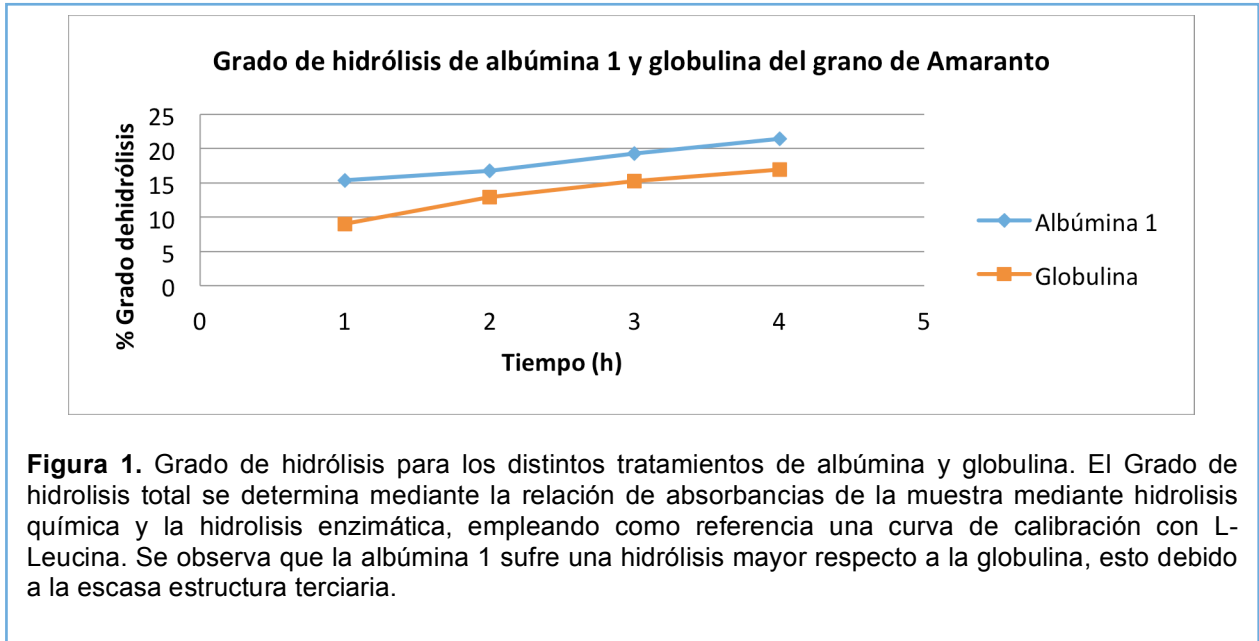
Tras obtener los hidrolizados proteicos, se determina el grado de hidrólisis (Adler-Nissen, 1979) para cada una de las fracciones proteicas. Además se realiza cromatografía de exclusión molecular utilizando sephadex G-15 empleando un buffer de fosfatos pH= 7.5 con β -mercaptoetanol, se colectaron las diferentes fracciones eluidas mediante un colector BioRad, se midió a dos longitudes de onda 220 nm y 280 nm para identificar las principales fracciones moleculares. Se evaluó la capacidad quelante de cobre (Chen *et al.*, 2006) de los hidrolizados obtenidos empleando buffer de hexamina 10 mM y solución de murexida 1mM, midiendo absorbancia a 530 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La extracción de las proteínas de interés se llevó a cabo mediante una solución de Na₂SO₄, y se ajustaron a una concentración de 2 mg/l cada una. Se siguió una hidrólisis con una serinproteasa para obtener la materia prima para iniciar la caracterización de cada tratamiento. El principio de la cromatografía de exclusión molecular resulta un método adecuado para la separación de dichas fracciones, se desarrollaron los perfiles de elusión para los hidrolizados de albúmina y globulina respectivamente, para identificar los principales fracciones de interés generados tras la hidrólisis.

De acuerdo con la literatura, la albúmina de amaranto presenta una escasa estructura terciaria, por lo que se facilita la desnaturación e hidrólisis de la misma, exponiendo grupos hidrofílicos para generar la ruptura del enlace peptídico en determinadas regiones generando así péptidos de diferentes pesos moleculares y bioactividades. En la figura 1 se observa el grado de hidrólisis para albúmina y globulina, para esta última se confirma que presentó un menor grado de hidrólisis respecto a la respuesta que se observa en albúmina.

El objetivo de esta prueba es la determinación de grupos α -amino libres, si bien el fundamento de la hidrólisis proteica es la ruptura del enlace peptídico y por ende la generación de péptidos de tamaño variable, cabe señalar que el grado de hidrólisis es una relación dependiente de factores como el pH, temperatura, fuerza iónica, actividad enzimática, así como de la conformación y actividad de la proteína. En el caso de la alcalasa, es una serinproteasa con amplia especificidad principalmente por sitios hidrofóbicos (Adler-Nissen, 1986). Se observa que el efecto de la temperatura es un factor determinante para realizar la ruptura del enlace peptídico, de acuerdo con Marcone y col. (1994), las globulinas experimentan como consecuencia del tratamiento térmico, un mayor desplegamiento que las albúminas, a pesar de la menor estabilidad de estas últimas. Este comportamiento se atribuye al bajo contenido de estructura terciaria de las albúminas.



Debido a que los hidrolizados presentan un grado de hidrólisis mayor al 10%, se reconoce que son hidrolizados extensivos, y su aplicación puede ser destinada en alimentación especializada, bien como suplemento proteínico o en dietas médicas (Meredith et al., 1990; Boza et al., 2000).

El creciente interés por capitalizar la funcionalidad de proteínas y péptidos bioactivos de fuentes naturales para la formulación de alimentos y dietas que aprovechen todas las propiedades funcionales de las proteínas sin perder el valor nutricional ha derivado en estrategias para determinar actividades más específicas como antioxidantes. Debido a ello, se abordó una prueba dentro de la categoría de la actividad antioxidante como es la prueba quelante de cobre. De acuerdo a los resultados que presentan en las figuras 2 y 3, la actividad que presentan los hidrolizados aumenta conforme han sido expuestos durante un mayor periodo a hidrólisis. Se observa diferencia significativa entre tratamientos, dicha actividad es sostenida a partir de las 3 horas hasta 21 y se incrementa a partir de 30 horas teniendo su máximo a las 36 horas de hidrólisis, esto puede ser resultado de la alta susceptibilidad por la hidrólisis de la proteína por lo que es probable que se generen péptidos con determinada secuencia de aminoácidos que propicien la formación del quelato. Así mismo, en el caso de la globulina la respuesta a la formación del quelato de cobre es sostenida hasta las 30 horas de hidrólisis e incrementa con el máximo a las 36. Ya se ha mencionado anteriormente las diferencias estructurales entre ambas proteínas, tanto como la disposición de la estructura terciaria, determina la factibilidad de la hidrólisis y la capacidad de la fracción proteica para formar el complejo con cobre, de ahí que se observe que conforme aumenta el grado de

hidrólisis aumenta la actividad quelante de cobre.

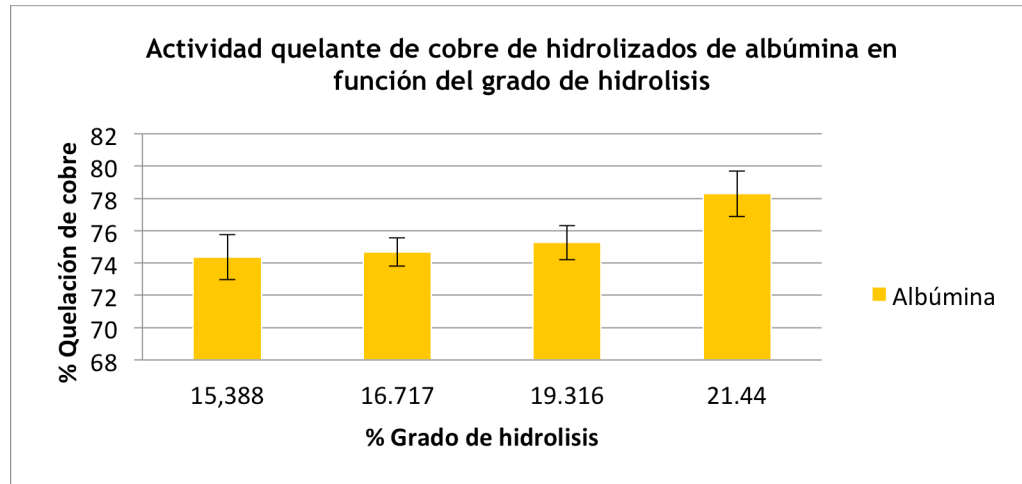


Figura 2. Actividad quelante de cobre en hidrolizados albúmina del grano de amaranto. Se observa que la actividad quelante de cobre aumenta conforme aumenta el tiempo de hidrólisis. Se observa que la mayor actividad de los hidrolizados proteicos es a un tiempo de hidrólisis a 36 horas. No existe diferencia significativa entre fracciones proteicas.

BIBLIOGRAFÍA.

Bressani, R., González, J.M., Zuñiga J, Breuner M y Elías L.G., Yield, selected chemical composition and nutritive value of 14 selections of amaranth grain

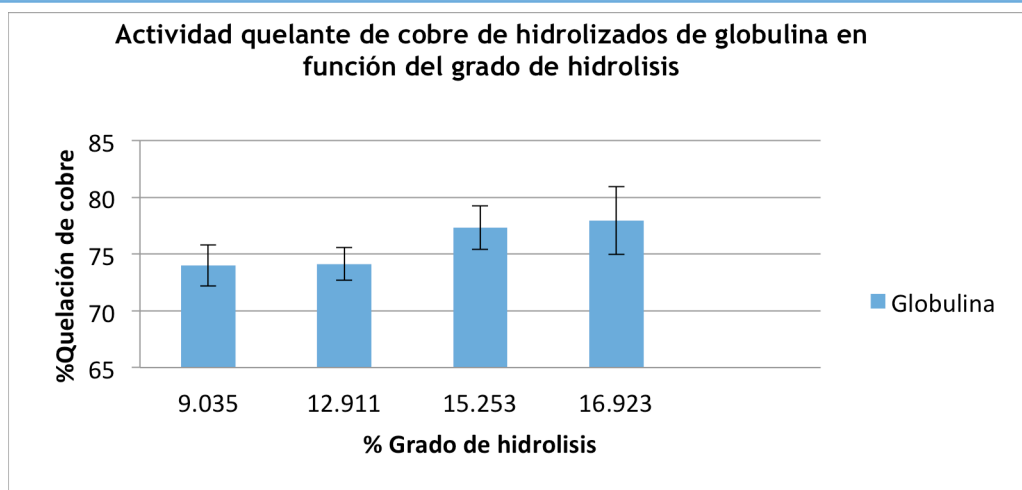


Figura 3. Actividad quelante de cobre en hidrolizados de globulina del grano de amaranto. Se observa que la actividad quelante de cobre aumenta conforme aumenta el tiempo de hidrólisis. Se observa que la mayor actividad de los hidrolizados proteicos es a un tiempo de hidrólisis a 36 horas. No existe diferencia significativa entre fracciones proteicas.

- representing four species. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 38: 347-353
- Guadix, A., Guadix, E. M. ; Páez-Dueñas, M.P.; Gonzáles-Tello, P. y Camacho, F. 2000. Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. *Ars Pharmaceutica*, 40:1, 80-82.
- Juan, R., Pastor, J., Alaiz, M., Megías, C., Vioque, J. 2007. Caracterización proteica de las semillas de once especies de amaranto. *Grasas y aceites*, 58 (1), 50,53-54.
- Contreras, E., Jaimez, J., Porras, G., Juárez, L.F., Añorve, J., Villanueva S., 2010. Propiedades fisicoquímicas y sensoriales de harinas para preparar atole de amaranto. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, V. 60 n.2, 1-3.
- Villanueva, O., Amao, I. 2007. Purificación de una proteína de 35 kDa rica en lisina, de la fracción albúmina de *Amaranthus caudatus*. *Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 68:4, 344-347.
- Gallegos, S., 2012. Actividad antioxidante y quelante de los productos de hidrólisis de proteínas de *Jatropha curcas* L. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de productos bióticos, 12-15.
- Paredes, F. M. 2013. Identificación de extractos de fuentes naturales con actividad inhibitoria de tirosinasa. Tesis para Maestría en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, 24-26, 29-30.
- Avanza, M. V., Añón, M. C. 2006. Efecto del tratamiento térmico en las propiedades fisicoquímicas de albúminas y globulinas de *Amaranthus Hypochondriacus*. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste*. Resumen: E-031, 1-4