

Capítulo 4 Obtención y caracterización de hidrolizados proteicos de quinoa y amaranto por digestión *in vitro*

Chapter 4 Obtaining and characterizing of protein hydrolyzates of quinoa and amaranth by *in vitro* digestion

VÁZQUEZ-LUNA, Alma†*, DÍAZ-VÁZQUEZ, Alma Elena, LEZAMA-PARADA, Luz Mariana y PIMENTEL-CORTÉS, Vanessa

Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana

Instituto de Investigaciones en Comportamiento Alimentario, Universidad de Guadalajara

ID 1^{er} Autor: Alma, Vázquez-Luna / **ORC ID:** 0000-0001-5648-7549, **CVU CONACYT ID:** 168130

ID 1^{er} Coautor: Alma Elena, Díaz-Vázquez / **ORC ID:** 0000-0002-5033-5218, **CVU CONACYT ID:** 933895

ID 2^{do} Coautor: Luz Marian, Lezama-Parada / **CVU CONACYT ID:** 946125

ID 3^{er} Coautor: Vanessa, Pimentel-Cortés / **CVU CONACYT ID:** 1066529

DOI: 10.35429/H.2020.8.48.58

A. Vázquez, A. Díaz, L. Lezama y V. Pimentel

almvazquez@uv.mx

A. Marroquín, J. Olivares, L. Cruz y A. Bautista. (Coord) Ciencias ambientales, uso de recursos. Handbooks-©ECORFAN-Mexico, Querétaro, 2020.

Resumen

En la actualidad se ha incrementado el consumo de alimentos que puedan suplir el consumo de carne. Esto debido al impacto ambiental que causa su producción, así como los daños a la salud que se han reportado en recientes estudios. Recientemente los pseudocereales han surgido como una alternativa, concretamente la quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) y el amaranto (*Amaranthus spp*). Dichos pseudocereales se caracterizan por aportar grandes cantidades de macronutrientes ayudando al correcto funcionamiento del organismo, promueven el crecimiento y regulan los procesos metabólicos. A pesar de esta reciente tendencia de consumo, aún no se ha evaluado la digestibilidad gástrica y duodenal *in vitro* para determinar cuánto de la proteína que se ingiere puede absorberse para ser aprovechada por el organismo. Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar lo anterior, por medio de la elaboración de harinas desengrasadas de quinoa y amaranto, a las cuales se les realizaron aislados proteicos a pH 2, 4 y 6. Posteriormente, se hidrolizaron los aislados mediante simulación gástrica a pH 4 debido a que fue el pH de mayor rendimiento. Se corrieron electroforesis SDS-PAGE. La digestión duodenal simulada se llevó a cabo con las enzimas papaína y bromelina. El rendimiento de los hidrolizados de proteína, así como su concentración fue mayor para quinoa a los diferentes pH ensayados a diferencia de amaranto. En la simulación gástrica se determinó que las proteínas mayoritarias en ambos pseudocereales fueron globulinas y albúminas. En la fase duodenal no se observó ninguna proteína. De acuerdo con los valores obtenidos se concluyó que las proteínas presentes en quinoa y amaranto presentan una excelente digestibilidad y por tanto pueden absorberse a través del duodeno.

Quinoa, amaranto, proteínas, electroforesis.

Abstract

Currently, the consumption of food that can replace the consumption of meat has increased. This is due to the environmental impact caused by its production, as well as the health damage that has been reported in recent studies. Recently, pseudocereals have emerged as an alternative to supplement that consumption, specifically quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) and amaranth (*Amaranthus spp*). These pseudocereals are characterized by providing large amounts of macronutrients, helping the body to function properly, promoting growth and regulating metabolic processes. Despite this recent consumption trend, gastric and duodenal digestibility *in vitro* has not yet been evaluated to determine how much of the protein ingested can be absorbed to be used by the body. Therefore, the objective of this work was to evaluate the above, by means of the preparation of defatted quinoa and amaranth flours, to which protein isolates were made at pH 2, 4 and 6. Subsequently, the isolates were hydrolyzed by gastric simulation at pH 4 because it was the highest yielding pH. SDS-PAGE electrophoresis was run. Simulated duodenal digestion was carried out with the papain and bromelain enzymes. The yield of the protein hydrolyzates, as well as their concentration was higher for quinoa at the different pHs tested, unlike amaranth. In the gastric simulation it was determined that the main proteins in both pseudocereals were globulins and albumins. In the duodenal phase, no protein was observed. According to the obtained values, it was concluded that the proteins present in quinoa and amaranth have excellent digestibility and therefore can be absorbed through the duodenum.

Quinoa, amaranth, proteins, electrophoresis

4. Introducción

Los cereales constituyen la base de la alimentación para gran parte de la población mundial, ocupando un lugar indiscutible en la base de la pirámide nutricional. Los pseudocereales quinoa (*Chenopodium Quinoa wild*) y amaranto (*Amaranthus spp*) han sido reconocidos por mucho tiempo como importantes cultivos alimenticios en las zonas centro y sur del continente americano (Vázquez et al., 2019). Son granos con una importante cantidad de proteínas y compuestos bioactivos superando en valor biológico a los tradicionales granos, como el maíz y trigo (Alvarez-Jubete et al., 2009; Alvarez-Jubete et al., 2010). La importancia de las proteínas en los alimentos radica en la gran variedad de funciones a nivel metabólico. En el adulto, la pérdida de proteína corporal se asocia con numerosas alteraciones patológicas y a un aumento en la mortalidad (Martínez y Martínez de Victoria, 2006).

Las proteínas están constituidas por unidades de aminoácidos (Gallegos et al., 2013). Los aminoácidos se clasifican en esenciales y no esenciales. Los primeros no son producidos por el organismo, por tanto deben de ser obtenidos a través de los alimentos de la dieta. En su mayoría pueden ser encontrados en alimentos de origen animal y derivados, así como en cereales integrales (González, 2014). De acuerdo con la FAO la quinoa y el amaranto aportan al menos diez de los aminoácidos esenciales dependiendo de la variedad que se trate (FAO/OMS/UNU, 1985). Por tanto, el valor biológico de una proteína depende fundamentalmente de su composición en aminoácidos; se ha observado que ciertos factores influyen en dicho valor, como la especie, edad y el estado fisiológico del cereal o pseudocereal.

Otro factor que condiciona la utilización de las proteínas alimenticias, modificándolas en forma variable es la digestibilidad. La digestibilidad será igual a 100 cuando el nitrógeno ingerido sea totalmente absorbido (Suárez et al., 2006). Para medir digestibilidad de proteínas se encuentran numerosos métodos entre los que destaca el método *in vitro*. El método *in vitro* es una simulación de las condiciones fisiológicas de la digestión *in vivo*, es una técnica ampliamente utilizada en campos como la nutrición, farmacología o química de los alimentos (Lucas, 2016). Para seleccionar el método más adecuado es importante tomar en cuenta que el método sea lo más simple posible, rápido, que arroje resultados reproducibles y posea una alta correlación con algún método *in vivo* (Hsu et al., 1977).

Tomando en cuenta lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo llevar a cabo un estudio comparativo de la digestibilidad que presentan los aislados de proteínas de la harina de amaranto y quinoa. Se seleccionaron dichos pseudocereales debido a: 1) el alto valor biológico de sus proteínas, 2) similitudes filogenéticas, 3) importancia en la agricultura mexicana, 4) fuente alternativa de proteína para personas que no pueden consumir alimentos cárnicos por patologías digestivas, enfermedades crónicas degenerativas o recursos limitados para su compra.

4.1 Material y Métodos

4.2 Pseudocereales

Debido a la importancia de los cultivos de pseudocereales en el continente americano, se buscó utilizar dos pseudocereales endémicos: quinoa y amaranto. La quinoa utilizada en este estudio fue traída de Chile, dado que se tiene registro de ser un cereal ancestral en este país, además de que la semilla ha sido mejorada genéticamente para adaptarse a diferentes zonas de cultivo. Con respecto al amaranto se seleccionó a México, por las mismas razones que se expusieron anteriormente para Chile. El amaranto utilizado proviene de cultivos establecidos en el estado de Puebla. Una vez que se tuvieron los pseudocereales se llevó a cabo la producción de las harinas. Ambas harinas fueron producidas a través de molienda en una licuadora comercial (marca Osterizer, Milwaukee, Wisconsin), posteriormente se tamizaron en una malla 200 (NOM-247-SSA1-2008), para finalmente empacar ambas harinas en bolsas de plástico laminadas y selladas (marca Osterizer, Milwaukee, Wisconsin) para almacenarlas a temperatura ambiente (25-28°C) y realizar las determinaciones que se describen a continuación.

4.3 Desengrasado de las harinas

La harina fue desengrasada mediante un proceso de extracción con n-hexano en una relación 1:10. Este proceso se realizó a temperatura ambiente con agitación continua durante 5 horas y posterior reposo durante 19 horas, completando el proceso en 24 horas de contacto de la harina con el solvente. Luego se separó la harina del hexano por filtración, dejándola bajo campana durante 12 horas esparcida sobre una superficie plana para eliminar los restos de hexano.

4.4 Obtención de aislados de proteína de quinoa y amaranto

El aislado proteico fue obtenido según el método descrito por Quelal et al. (2019). Se utilizó harina desengrasada para ambos pseudocereales. La harina fue suspendida en agua destilada, en una relación 1:10 harina/agua, se llevó a pH 8.0 bajo agitación intensa durante una hora controlando el pH regularmente para obtener una precipitación isoeléctrica. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó durante 30 min a 10,000 rpm a una temperatura de 4 °C usando una centrífuga MIKRO 220R (marca Hettich).

El sobrenadante, se llevó a pH 2, 4 y 6 con una solución HCl 2 N para precipitar las proteínas, manteniéndolo durante 10 min bajo agitación, posteriormente se centrifugó durante 20 min a las mismas condiciones. El precipitado de proteínas se suspendió en agua llevando el pH a 7.0. Posteriormente se ultracongeló la suspensión a -86 °C y se liofilizó a -50 °C, conectando los frascos con la suspensión al equipo de secado en frío FreeZone 6 liter de Labconco durante 48 h. El liofilizado obtenido se homogenizó y se guardó en frascos herméticamente cerrados a 4 °C hasta su utilización. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado (n = 3).

4.5 Hidrólisis enzimática del aislado de proteínas

La hidrólisis se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Nongonierma y FitzGerald (2015), con modificaciones. El aislado de proteínas se resuspendió en agua destilada a (25 g/L), ajustando el pH a 2.0 con NaOH 0.5 M y se dejó hidratar durante 30 minutos a 50 °C. Se usaron preparaciones enzimáticas de papaína obtenidas a partir de látex de *Carica papaya*, añadiéndose en una relación enzima:sustrato (E:S) del 2% (v/p) y realizándose la hidrólisis a 50 °C durante 180 min. Una muestra control sin enzimas, se mantuvo en las mismas condiciones que la muestra de reacción. Las enzimas se inactivaron por calor en un baño de agua a 90 °C. Los hidrolizados generados con papaína se liofilizaron conectando los frascos con los hidrolizados al equipo de secado en frío FreeZone 6 liter de Labconco durante 48 h y almacenaron a -20 °C antes de análisis posterior. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado (n = 3).

4.6 Cuantificación de proteínas de los aislados

4.7 Método de Bradford

Se utilizó azul de Coomassie G250, etanol 2.5 mL, ácido fosfórico 5 mL y agua 50 mL, se mezclaron en ese orden, se agitaron y filtraron. Para la curva de papaína, se colocaron 20 mL de muestra en un tubo de hemólisis. Se agregaron 50 mL de NaOH 1 N más 1 mL de reactivo de color e incubaron por 5 min, se midió la absorbancia a 590 nm en cubetas de vidrio usando un espectrofotómetro de placas modelo Elx800 marca BioTek. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado (n = 3).

4.8 Método de Kjeldahl

Se pesó 1 g de muestra y se colocó cuantitativamente en un matraz de Kjeldahl, se añadieron 2 g de sulfato de cobre, 10 g de sulfato de sodio anhidro, 25 mL de ácido sulfúrico y perlas de vidrio. Se colocó el matraz cuidadosamente en el digestor durante 45 min y posteriormente fue calentada hasta que toda la muestra estuvo carbonizada, se aumentó la temperatura progresivamente hasta que la disolución se mostró totalmente clara, se dejó por 30 min a esta temperatura. Posteriormente se dejó enfriar y se añadieron de 400 a 450 mL de agua destilada para disolver por completo la muestra; se agregaron 3 o 4 gránulos de zinc, y un poco de parafina cuando se requirió y por último 50 mL de hidróxido de sodio 1:1. Seguido estos pasos, se conectó inmediatamente el matraz a un sistema de destilación, en el cual previamente se colocó un matraz Erlenmeyer de 500 mL que contenía 50 mL de ácido bórico y unas gotas del reactivo Shiro Tashiro como indicador en la salida del refrigerante. Se destiló hasta que el amoníaco fue eliminado, posteriormente se retiró el matraz Erlenmeyer y se tituló el destilado con HCl 0.1 N (AOAC, 2015). Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado (n = 3).

Fórmula para determinación de proteínas

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{V \times N \times 0.14}{m} (100)$$

Donde:

V= Volumen de ácido clorhídrico empleado en la titulación

N= Normalidad del ácido clorhídrico (0.1)

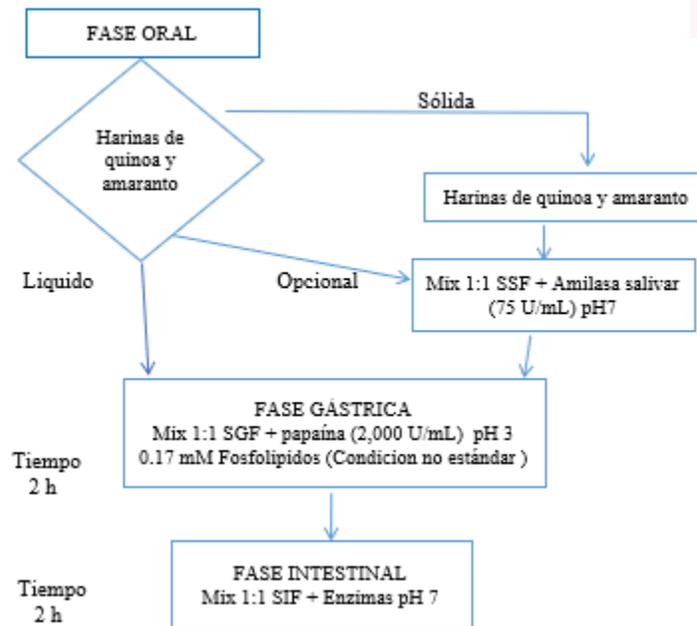
m= Masa de la muestra

0.014= Equivalente del nitrógeno

4.9 Protocolo experimental de simulador *in vitro*

El método *in vitro* utilizado estuvo basado en el protocolo Minekus et al. (2014). Se realizó un método de digestión estandarizado y práctico basado en condiciones fisiológicamente relevantes, que se pudieran aplicar para varios puntos finales y que pueden modificarse para adaptarse a otros requisitos específicos (véase Figura 4.1).

Figura 4.1 Diagrama de flujo de simulador *in vitro*.



Nota. Adaptado de “A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus” (Minekus et al., 2014).

4.10 Preparación de soluciones madre de fluidos de digestión simulados

Los volúmenes se calcularon para un volumen final de 500 mL para cada fluido simulado. Estos concentrados de 1.25 se denominaron soluciones de electrólito de líquido salival simulado (SSF), líquido gástrico simulado (SGF) y líquido intestinal simulado (SIF) (véase Tabla 4.1).

Tabla 4.1 Preparación de soluciones madre de fluidos de digestión simulados.

Constitución	Stock concentración		SSF pH 7		SGF pH 3		SIF pH 7	
	g L ⁻¹	mol L ⁻¹	Volumen de valores	Concentración en SSF	Vol. de valores	Concentración en SGF	Volumen de valores	Concentración en SIF
			MI	mmol L ⁻¹	MI	mmol L ⁻¹	MI	mmol L ⁻¹
KCl	37.3	0.5	15.1	15.1	6.9	6.9	6.8	6.8
KH ₂ PO ₄	68	0.5	3.7	3.7	0.9	0.9	0.8	0.8
NaHCO ₃	84	1	6.8	13.6	12.5	25	42.5	85
NaCl	117	2	-	-	11.8	47.2	9.6	38.4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30.5	0.15	0.5	0.15	0.4	0.1	1.1	0.33
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0.5	0.06	0.06	0.5	0.5	-	-
Para ajuste de pH								
	mol L ⁻¹		MI	mmol L ⁻¹	MI	mmol L ⁻¹	MI	mmol L ⁻¹
NaOH	1		-	-	-	-	-	-
HCl	6		0.09	1.1	1.3	15.6	0.7	8.4
CaCl₂(H₂O)₂ no se agrega a los fluidos de digestión simulados								
	g L ⁻¹	mol L ⁻¹		mmol L ⁻¹		mmol L ⁻¹		mmol L ⁻¹
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	44.1	0.3		1.5 (0.75 *)		0.15 (0.075*)		0.6 (0.3*)

Nota. Adaptado de Fuente: (Minekus et al., 2014)

4.11 Fase oral

La masticación de alimentos sólidos se simuló con una cantidad de alimento previamente triturado en una licuadora convencional. La solución madre SSF se agregó para crear una consistencia similar a una pasta delgada. Se colocó una porción de alimento y SSF de 50:50 (w/v). Como el alimento utilizado contiene almidón se usó α -amilasa salival 75 U/mL, seguida de CaCl_2 0.75 mM y la cantidad necesaria de agua hasta completar la dilución. El tiempo recomendado con la enzima fue de 2 min a 37 °C, lo que requirió de un precalentamiento de todos los reactivos a dicha temperatura, usando un baño de temperatura controlada marca LABCONCO.

4.12 Fase gástrica

Cinco partes de alimento líquido o bolo oral, se mezclaron con 4 partes de solución de electrólito de reserva de SGF para obtener una proporción final de alimento a SGF de 50:50 (v/v) después de la adición de otros recipientes y agua. Se agregó papaína previamente liofilizada 2000 U/mL, seguido de HCl 1 M hasta reducir el pH a 3.0. Finalmente se agregó agua hasta completar la dilución. El tiempo de digestión fue de 2 horas a 37°C en un baño de temperatura marca LABCONCO.

4.13 Fase intestinal

Cinco partes de quimo gástrico se mezclaron con cuatro partes de solución madre SIF para obtener una relación final de quimo gástrico a SIF de 50:50 (v/v) después de las adiciones de otros recipientes y agua. Las muestras gástricas-quimo se mezclaron con electrolito SIF solución de electrólito stock. Se requirió la adición de una base (NaOH 1 M) para neutralizar la mezcla a pH 7.0.

4.14 Electroforesis (SDS PAGE)

Mediante electroforesis SDS-PAGE se caracterizó el aislado proteico puro de quinoa y los hidrolizados de proteínas de quinoa, se usaron geles de poli(acrilamida) al 12 %, para determinar los pesos moleculares aproximados de las proteínas del aislado y de los hidrolizados. Se usó un estándar de pesos moleculares (14-140 kDa) de la marca Bio-Rad®, Hercules, CA, EE.UU. Se agregaron 20 μL de muestra y 10 μL de estándar en los pocillos del gel, la electroforesis se llevó a cabo en el equipo Bio-Rad Modelo PowerPac™ Basic a 120 voltios durante 120 minutos. Las bandas de polipéptidos se tiñeron de azul brillante de Coomassie G-250 durante 24 horas y posteriormente se destiñó con una solución de ácido acético (5 %), agua y metanol (50 %) por 24 horas. Las masas moleculares relativas de proteína se determinaron mediante una comparación con marcadores de peso molecular (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) y el software Quantity One del equipo ChemiDoc (Bio-Rad).

4.15 Análisis Estadístico

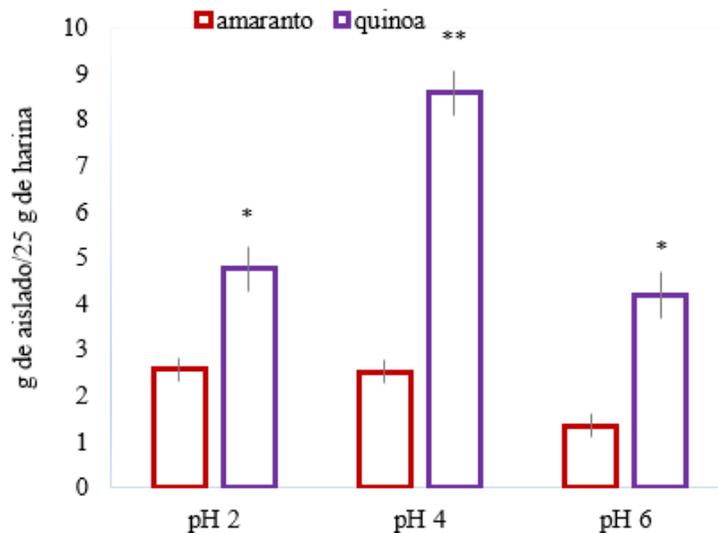
Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía donde los tratamientos fueron los pseudocereales empleados y las variables de respuesta los resultados obtenidos de las diferentes determinaciones, cuando hubo diferencia significativa se realizó la comparación de medias por la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0.05.

4.16 Resultados y Discusión

4.17 Obtención de aislados proteicos a partir de harina desengrasada

Una vez obtenidos los aislados proteicos a pH 2, 4 y 6 liofilizados, se calculó el porcentaje de rendimiento del proceso de extracción. Para ello se pesaron las tres réplicas de los distintos pH. Se calculó la desviación estándar y se representaron los valores como la media \pm SD. En la figura 2 podemos ver que el mayor rendimiento fue para los aislados proteicos de quinoa sometidos a pH 4, a diferencia del rendimiento de amaranto el cual se mantuvo constante en los pH 2 y 4, también podemos observar diferencias significativas entre los rendimientos de amaranto y quinoa ($p < 0.05$).

Figura 4.2 Rendimiento promedio del proceso de aislamiento de los péptidos a los diferentes valores de pH.



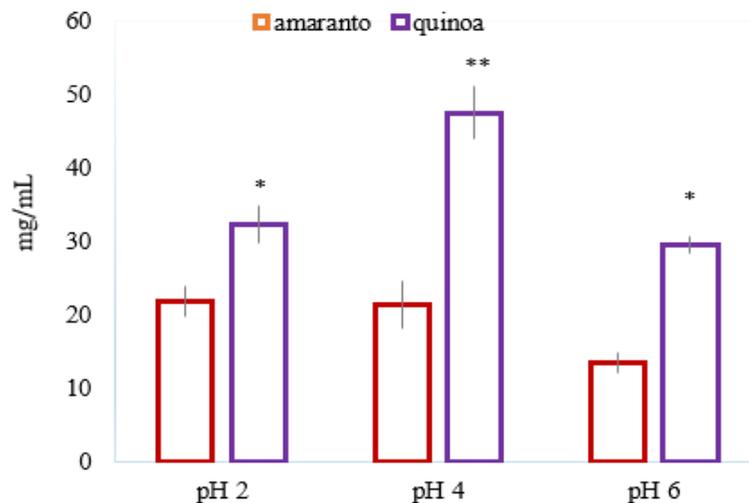
En un estudio reportado por Callisaya, et. al. (2009), se compararon los aislados proteicos de quinoa (*Chenopodium quinoa*) y cañahua (*Chenopodium pallidicaule*), los cuales se realizaron en torno al pH isoelectrico y se demostró que la variación del pH influyó sobre la apariencia física de la proteína aislada, obteniendo un mejor rendimiento a pH 3.02, sin embargo, la apariencia física de la proteína cambió considerablemente precipitando en forma de agregados o grumos. Por otra parte Castel (2010), determinaron que el rendimiento más alto en amaranto se obtiene a pH de 4.6 y, que la concentración más alta se encuentra en la cáscara que en el perisperma, en el presente trabajo se obtuvo un rendimiento parecido a pH de 2 y de 4 para amaranto, sin embargo en ambos casos fue menor al obtenido con quinoa. El cuerpo humano tiene un complejo sistema para descomponer las proteínas. En la ingesta de alimentos en la boca se mezclan con la saliva que en su mayoría es amilasa, más tarde el bolo es sujeto a un proceso gástrico donde varía el pH y actúan enzimas (amilasas, proteasas y lipasas) y con surfactantes (sales biliares y fosfolípidos) en el duodeno. Dependiendo del grado de hidrólisis en la fase gástrica y duodenal, las proteínas de los alimentos son degradadas a fragmentos más pequeños, para que puedan atravesar la capa de moco del epitelio, para ello son convertidas en moléculas más pequeñas; como aminoácidos, di y tripéptidos (Thomas et al., 2004).

4.18 Cuantificación de proteínas de los aislados

4.19 Método de Bradford

En la Figura 4.3 se presentan los resultados obtenidos para la determinación de proteínas para los diferentes pH utilizados anteriormente, cómo se puede observar hubo diferencias significativas entre quinoa y amaranto ($p < 0.05$) independientemente del pH utilizado.

Figura 3. Contenido de proteína en aislados de quinoa y amaranto



Castel (2010) obtuvo un rendimiento parecido en diferentes variedades de amaranto cuando se acercaron al punto isoeléctrico de las proteínas como en el presente estudio. Por otra parte Abugoch et al. (2008) determinaron que a pH menor a 5 las proteínas de quinoa empiezan a precipitar obteniendo un rendimiento mayor para los aislados de proteína, en este trabajo la mayor concentración de proteínas se obtuvo a pH 4. En general los trabajos que se han reportado mencionan que la extracción ácida ofrece un mejor rendimiento para los aislados proteicos y que el tamaño pequeño del gránulo de almidón de amaranto dificulta su separación en los procesos de clarificación y centrifugación (Cordero et al., 2005)

4.20 Cuantificación de proteína sin digerir en los aislados de amaranto y quinoa por el método de Kjeldahl

Se determinó el porcentaje de solubilidad de las proteínas en los aislados proteicos. Las muestras se tomaron al inicio de la incubación (tiempo 0) y a las 24, 48 y 72 h. En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos para la proteína total y soluble, con respecto a la primera no se observaron diferencias significativas para ambos pseudocereales solubilidad de proteínas a los intervalos de tiempo estudiados, se obtuvieron diferencias significativas entre la proteína de quinoa ($p < 0.05$) con respecto a la de amaranto, sin importar el tiempo de incubación. Las proteínas utilizadas como aditivos en alimentos pueden ser parcialmente o completamente solubles o completamente insolubles en agua, el concepto realmente novedoso desde el punto de vista nutricional es la utilización de la proteína y/o de sus péptidos con el propósito fundamental de mejorar una función biológica o de tratar de prevenir o reducir el riesgo de una enfermedad (Martínez & Martínez de Victoria, 2006; Hidalgo et al., 2018).

Tabla 4.2 Concentración de proteínas totales en harina de amaranto y quinoa

Tiempo de incubación (h)	Harina de amaranto		Harina de quinoa	
	Proteína total (mg/mL)	Proteína soluble (mg/mL)	Proteína total (mg/mL)	Proteína soluble (mg/mL)
0	3.9 ± 0.02	0	3.6 ± 0.08	0
24	3.5 ± 0.1	0.48 ± 0.01	3.5 ± 0.1	0.21 ± 0.01
48	3.4 ± 0.04	0.44 ± 0.4	3.6 ± 0.03	0.23 ± 0.1
72	3.7 ± 0.01	0.49 ± 0.02	3.7 ± 0.01	0.25 ± 0.02

*Nota: *Los datos representan la media ± desviación estándar*

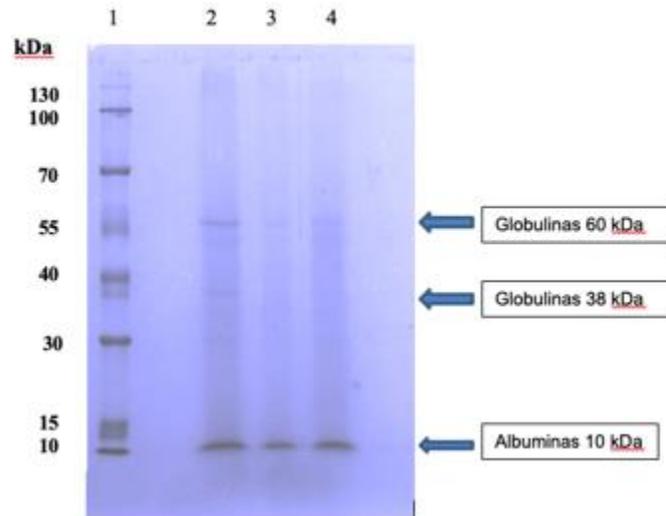
4.21 Análisis de aislados e hidrolizados enzimáticos de proteína de amaranto y quinoa mediante electroforesis

Se encontraron proteínas en diferentes bandas de peso molecular para amaranto, las proteínas más abundantes estuvieron en 100, 60 (globulinas), 36, 22 y 10 kDa (albúminas). Se ha reportado que las albúminas tienen un peso menor a 30 kDa y que suelen ser las más abundantes en amaranto, por otra parte las globulinas son intermedias presentan pesos entre 60 a 80 kDa generalmente se les conoce como proteínas de reserva en el amaranto (Juan et. al., 2007; Castel, 2010). En cuanto a la quinoa se observaron bandas a los 70, 55, 40, 35, 20 y 10 kDa, básicamente globulinas y albúminas. Estos resultados también fueron observados por Abugoch et. al., 2008 y Toapanta en 2016 con otras variedades de quinoa. Las globulinas tienen dos grupos en función de su coeficiente de sedimentación: 11S-12S y 7S-8S. Las proteínas predominantes de almacenamiento de la quinoa son globulinas 11S y 7S.

4.22 Fase gástrica

En la Figura 4 se observan los perfiles proteicos de amaranto y quinoa obtenidos mediante electroforesis en presencia del simulador gástrico. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, en el carril 2 se observaron bandas para amaranto a pesos moleculares de 60, 34 y 10 kDa y en el carril 4 se observan bandas a 60 y 10 kDa para quinoa. Toapanta en 2016 también observó estas mismas bandas en quinoa, aún cuando diluyó sus muestras en una proporción de 1:4, aparecían las bandas de globulinas y albúminas en el gel de electroforesis.

Figura 4.4 Electroforesis SDS-PAGE de aislado de proteínas de quinoa y amaranto



4.23 Fase intestinal

No se observaron bandas en las electroforesis que se llevaron a cabo para la fase intestinal, ni en amaranto ni en quinoa, éstas fueron hidrolizadas completamente para cada una de las repeticiones llevadas a cabo. Aproximadamente entre el 85 – 90 % de la proteína que alcanza el intestino delgado es digerida, el resto se excreta por las heces, las células de la mucosa intestinal sólo puede dejar pasar aminoácidos y pequeños oligopéptidos. La biodisponibilidad de las proteínas expresa la proporción de la cantidad total de aminoácidos de la dieta que pueden ser absorbidos y utilizados metabólicamente (Martínez & Martínez de Victoria, 2006).

4.24 Conclusión

Los aislados de proteínas de quinoa a pH 4 fueron los de mayor rendimiento y de mayor contenido proteico, incluso superior a los de amaranto en todos los tratamientos ensayados. Las proteínas de quinoa y amaranto obtenidas durante la simulación gástrica y determinadas mediante electroforesis fueron globulinas y albúminas, con pesos moleculares entre 60 y 10 kDa. La digestión duodenal fue total para ambos pseudocereales como se observó en los geles de electroforesis obtenidos por lo que podríamos hablar de una buena biodisponibilidad de las proteínas de quinoa y amaranto.

4.25 Agradecimiento

Las autoras agradecen al Dr. Francisco Fuentes Profesor-Investigador de la Pontificia Universidad Católica de Chile quien donó la quinoa utilizada en la presente investigación, con quien actualmente estamos trabajando mediante Convenio Institucional para poder cultivar quinoa chilena en México.

4.26 Referencias

Abugoch L. (2009). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) composition, chemistry, nutritional, and functional properties. *Advances in Food and Nutrition Research*. 58(1):1-31. doi: 10.1021/jf703689u
 Álvarez-Jubete, L., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2009). Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 60(4): 240-257. doi.org/10.1080/09637480902950597

Álvarez-Jubete, L., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2010). Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends in Food Science and Technol.* 21(2): 106-113. doi.org/10.1016/j.tifs.2009.10.014

AOAC. (2015). *Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist*. Washington D.C., US: (Horwitz W., Latimer G., edits), p. 24.

Callisaya, A.J.C. & Alvarado, K.J.A. (2009). Aislados proteínicos de granos altoandinos chenopodiaceas: Quinoa “*Chenopodium quinoa*”, Cañahua “*Chenopodium pallidicaule*” por precipitación isoeléctrica. *Revista Boliviana de Química*. 26(1):12-20 Recuperado de: http://scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-546020090001000

Castel, M.V. (2010). *Estudio de las propiedades funcionales, tecnológicas y fisiológicas de las proteínas de amaranto*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional del Litoral, Argentina. pp. 64-65. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/11185/212>

Cordero, M.Y., Osuna-Castro J.A., Borodanenko, A., & Paredes-López, O. (2005). Physicochemical and functional characterisation of amaranth (*amaranthus hypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellisation. *Food Science and Technology International*. 11:269-280. doi.org/10.1177/1082013205056491

World Health Organization FAO/WHO/UNU (1985). Expert Consultation. Energy and Protein Requirements. Technical Report Series 724. Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39527>

Gallegos S. T., Chel G. L., Corzo R. L. J., & Martínez, A. L. (2013). *Péptidos con actividad antioxidante de proteínas vegetales*. En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero & D. Betancur Ancona (Eds.), *Bioactividad de péptidos de proteínas alimentarias* (pp. 111-122). Barcelona: OmniaScience

González, V. L. (2014). La información a los consumidores sobre la ausencia o presencia reducida de gluten en los alimentos. *Revista de Derecho Agrario y Alimentario* 65(2). Recuperado de: https://works.bepress.com/luis_gonzalez_vaque/110/

Hidalgo, A., Ferraretto, A., De Noni, I., Bottani, M., Cattaneo, S., Galli, S., & Brandolini A. (2018). Bioactive compounds and antioxidant properties of pseudocereals-enriched water biscuits and their in vitro digestates. *Food Chemistry*. 240: 799-807. doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.014

Hsu, H. W., Vavak D. L., Satterlee L. D. y Millar G. A. (1977). A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of food Science*. 42: 1269-1273. doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb14476.x

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):49-55. Recuperado de: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/1510/1/vioquegya.pdf>

Lucas-González, R. (2016). Digestión de alimentos: Tendencias en los modelos de digestión in vitro. *Revista doctorado UMH*. 2(2): p5. doi: <https://doi.org/10.21134/doctumh.v2i2.1278>

Martínez, A. O. & Martínez de Victoria, N. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*. 21:1-14. Recuperado de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112006000500002

Minekus, M., Alminger, P., Alvito, S., Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F., Carriere, R., Boutrou, M., Corredig, D., Dupont, C., Dufour, L., Egger, M., Golding, S., Karakaya, B., Kirkhus, S., Feunteun, U., Lesmes, A., Macierzanka, A., Mackie, S., Marze, D.J., McClements, O., Menard, I., Recio, C.N., Santos, R.P., Singh, G.E., Vegarud, M.S., Wickham, J., Weitschies, W., & Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food and Function* 5: 1113-1124. doi: 10.1039/c3fo60702j

Nongonierma, A.B., & FitzGerald, R.J., (2015). Investigation of the potential of hemp, pea, rice and soy protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides. *Food Digestion: Research and Current Opinion* 6: 19-29. DOI: 10.1007/s13228-015-0039-2, 1-11.

Quelal, M., Nazate, K., Villacrés, E., & Cuarán, J. (2019). Obtención y caracterización de un hidrolizado proteico de quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*). *Enfoque UTE*. 10(2):79-89. http://ingenieria.ute.edu.ec/enfoqueute/public/journals/1/html_v10n2/art007.html

Suárez, M., Kizlansky, A., & López, L. B. (2006). Evaluación de la calidad de las proteínas en los alimentos calculando el score de aminoácidos corregido por digestibilidad. *Nutrición Hospitalaria*. 21(1):47-51. Recuperado de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112006000100009

Thomas, K., Aalbers, M., Bannon, G. A., Bartels, M., Dearman, R. J., Esdaile, D. J., Fu, T. J., Glatt, C. M., Hadfield, N., Hatzos, C., Hefle, S. L., Heylings, J.R., Goodman, R. E., Henry B., Herouet, C., Holsapple, M., Ladics, G. S., Landry, T. D., & Zawodny, J. (2004). A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 39(2):87-98. doi: 10.1016/j.yrtph.2003.11.003.

Vázquez-Luna, A., Fuentes, F., Rivadeneyra, E., Hernández, C., & Díaz-Sobac, R. (2019). Nutritional content and functional properties of quinoa flour from Chile and Mexico. *Ciencia e Investigación Agraria*. 46(2): 144-153. doi: 10.7764/rcia.v46i2.2099