



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

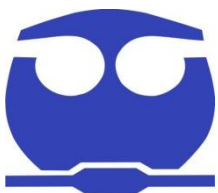
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ESPUMAS Y EMULSIONES DE
HIDROLIZADOS DE ALBÚMINA 1 Y GLOBULINA DEL GRANO DE
AMARANTO *Amaranthus hypochondriacus L.*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

DANIEL RAMOS BERNAL



México, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: María de los Ángeles Valdivia López

VOCAL: Vanessa Rebeca Maya Ampudia

SECRETARIO: Jorge Soriano Santos

1er. SUPLENTE: Laura Carmona Salazar

2º SUPLENTE: Lilitiana Rocío González Osnaya

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM Unidad Iztapalapa en la planta piloto No. 1

ASESOR DEL TEMA: Dr. Jorge Soriano Santos

FIRMA _____

SUSTENTANTE: Daniel Ramos Bernal

FIRMA _____

Agradecimientos

A Ezequiel Bernal donde quiera que estés. Gracias.

A Silvia y Daniel por brindarme las herramientas para crecer, por ser guías incomparables, el ejemplo de esfuerzo y lucha, a ellos toda mi admiración.

A Diana, una mujer llena de perseverancia y paciencia, gracias por enseñarme a las dos personitas mas especiales en este mundo Leo y Andrea.

Al Dr. Soriano y al M en B Erik por abrirme las puertas para la realización de este trabajo, gracias por compartir su gran conocimiento.

A Belem, Mary, Adriana y Angie por sus consejos y aportaciones para este trabajo, son un gran modelo a seguir.

A todos mis cómplices: Valeria, Ale, Eri, David, Lau, Uriel, San, Beto, Ivy, Bren, Ana, Fer, Roca, Maro, Bubu, Lalo, Coco, Ezequiel, Ara, de verdad sin ustedes no lo hubiera podido lograr muchachos, cada uno de ustedes lleva un lugar en mi corazón muy especial.

Proyecto realizado en el Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.



INDICE

I. RESUMEN	
II. GENERALIDADES.....	1
2.1 Amaranto.	1
2.2 Hidrolizados proteicos.	5
2.3 Propiedades funcionales.	6
2.3.1. Solubilidad.	7
2.3.2. Propiedades emulsificantes.	7
2.3.3 Propiedades espumantes.	8
2.4 Superficie de respuesta	8
2.5 Antioxidantes.....	9
2.5.1 Métodos de cuantificación de actividad antioxidante.	11
2.5.2. Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•).	11
2.5.3. Método de decoloración del radical catiónico 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico (ABTS ⁺)).....	12
2.5.4 Sistema ABTS/lacasa.....	13
2.5.5 Ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBA).	13
2.5.5 Péptidos antioxidantes.....	14
III. TRABAJOS PREVIOS	16
IV. JUSTIFICACIÓN	17
V. OBJETIVOS	18
VI. HIPÓTESIS	19
VII. MATERIALES Y METODOS.	20
7.1. Molienda y desgrasado de los granos de amaranto.	20
7.2. Extracción de albúmina 1 y globulina.	20
7.2.1 Cuantificación de proteína.....	22
7.3. Hidrólisis enzimática de Albúmina 1 y Globulina con pepsina.....	24
7.3.1 Determinación de grado de hidrólisis (GH).	24

7.4 Determinación de propiedades funcionales de los hidrolizados de albúmina 1 y globulina.	25
7.4.1 Capacidad de emulsificación.	25
7.4.2 Estabilidad de emulsión.	25
7.4.3 Capacidad de espumado.	26
7.4.4 Estabilidad de espumado.	26
7.4.5 Solubilidad.	27
7.4.6 Superficie de Hidrofobicidad.	27
7.5 Caracterización de especies peptídicas de los hidrolizados por PMr.....	28
7.6 Evaluación de actividad antioxidante.....	28
7.6.1 Método de Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil DPPH*	29
7.6.2 Método de decoloración de radical catiónico ABTS ⁺	29
7.7 Análisis Estadístico.	30
7.7.1 Optimización utilizando la metodología de superficie de respuesta.	30
VIII.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
8.1 Hidrólisis de albúmina 1 y globulina.	31
8.2 Propiedades Funcionales de hidrolizados de albúmina 1.....	32
8.2.1 Capacidad y estabilidad de emulsión.	32
8.2.2 Capacidad y estabilidad de espumado.....	34
8.2.3 Hidrofobicidad.	35
8.2.4 Solubilidad	36
8.3 Propiedades Funcionales de hidrolizados de globulina.....	37
8.3.1 Capacidad y estabilidad de emulsión.	37
8.3.2 Capacidad y estabilidad de espumado.....	39
8.3.3 Hidrofobicidad	41
8.3.4 Solubilidad.	42
8.4 Caracterización de especies peptídicas de los hidrolizados.	43
8.5 Superficies de respuesta (optimización).	48
8.5.1 Propiedades funcionales de hidrolizados de albúmina 1.....	48
8.5.2 Propiedades funcionales de hidrolizados de globulina.....	51
8.6 Actividad Antioxidante.	56

INDICE

8.6.1 Espumas y emulsiones con actividad antioxidante de hidrolizados de albúmina 1.....	56
8.6.2 Espumas y emulsiones de hidrolizados de globulina.....	58
IX. CONCLUSIONES	61
ANEXOS	62
X. BIBLIOGRAFÍA.....	75

I. Resumen

Las propiedades funcionales de los hidrolizados proteicos presentan un gran potencial para su uso como ingredientes en la preparación de alimentos. Hasta el momento no existe una investigación extensa sobre el estudio de estas propiedades en las proteínas del amaranto, lo cual resulta importante ya que inciden en las propiedades físicas y organolépticas de los alimentos que los contienen, sin dejar a un lado su aporte nutricional. El conocimiento de la relación entre proteína-estructura en el alimento puede ayudar a esclarecer aquellos mecanismos involucrados en la funcionalidad de las proteínas, de tal manera que un cambio en la estructura nativa y biológica conducirá a un impacto significativo en el alimento. Se ha observado que los hidrolizados de proteína potencian diversas características funcionales, tales como la viscosidad, aumento en la solubilidad y capacidad espumante, así como la emulsificante. Adicionalmente a las propiedades tecnológicas los hidrolizados pueden presentar actividad biológica como la antioxidante, esto debido a la liberación de péptidos específicos. La selección de una enzima hidrolítica determina qué fracciones peptídicas se forman debido a la especificidad de la misma y como resultado se obtendrán hidrolizados con diferente funcionalidad tecnológica y biológica, es decir, se obtendrían espumas, emulsiones o geles con una función tecno-biofuncional, lo cual resultaría en la producción de materias primas de valor agregado obtenidas a partir de amaranto. Por lo tanto, en este proyecto se evaluó la actividad antioxidante (AAOx) de espumas y emulsiones de hidrolizados de albúmina 1 y globulina del grano de *Amaranthus hypochondriacus* L. Los hidrolizados se obtuvieron utilizando pepsina hasta alcanzar grados de hidrólisis (GH) del 2, 5 y 10 %; las mejores condiciones encontradas fueron: E/S=50.4 U/g de proteína; T= 37°C; pH= 2.0. Posteriormente, en cada hidrolizado se evaluaron las propiedades de solubilidad y actividades de formación de espumas y emulsificación; se determinó la composición peptídica con base al peso molecular relativo y la

optimización de las propiedades de espumado y emulsificación se realizó por el método de superficies de respuesta. También se evaluó la actividad antioxidante a los hidrolizados que presentaron las mejores condiciones de GH y pH para la formación de espumas y emulsiones. Se observó que la hidrólisis con pepsina con GH del 2 al 10% en ambas proteínas resulta en una mejora de las propiedades de emulsificación, espumado y solubilidad, en comparación a las propiedades observadas sobre las mismas proteínas sin hidrolizar. Las espumas y emulsiones formadas a partir de hidrolizados de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto presentaron AAOx, la cual se evaluó como el % de inhibición del DPPH* (% I DPPH*), observándose que en los GH 10 y 7% correspondientes a 12 y 3.3 h, respectivamente, se formaron las espumas y emulsiones con los valores más altos de actividad antioxidante (70% I DPPH*). Se encontró que la modificación de las propiedades funcionales de los hidrolizados de albúmina 1 y globulina, dependen de diferentes factores fisicoquímicos como son: grado de hidrólisis, pH, presencia de grupos hidrofóbicos y de la distribución del peso molecular; también se observó que conforme aumenta el grado de hidrólisis existe un incremento en la AAOx. Con la aplicación de los resultados de este proyecto se podrían obtener espumas y emulsiones con AAOx, lo cual resultaría en la obtención de materias primas de valor agregado obtenidas a partir del grano de amaranto y en consecuencia se podría incentivar este cultivo y encontrarle una aplicación en el diseño de alimentos funcionales

II. GENERALIDADES

2.1 AMARANTO.

El gran potencial nutrimental del grano de amaranto fue encontrado ya hace mucho tiempo por las culturas ancestrales de América; como los Aztecas y los Incas, siendo uno de los principales cultivos. Su presencia en Tehuacán México, se remota a 4000 a.C.; lo que lo convierte en uno de los cultivos más antiguos.

La Familia *Amaranthaceae* comprende más de 60 géneros y aproximadamente 8000 especies de plantas herbáceas anuales o perennes. A través de la historia las hojas de amaranto han sido consumidas como vegetales y sus semillas como cereal. Existen tres especies del género *Amaranthus* (griego "que no se marchita") que producen grandes inflorescencias repletas de semillas comestibles: *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, que son cultivadas principalmente en México y Guatemala y *A. caudatus*, que es cultivada específicamente en Perú.

Alrededor de 60 de las 800 especies de las plantas de la familia *Amaranthaceae* son cosmopolitas y crecen particularmente en sitios perturbados por el hombre considerándose como maleza.

El amaranto es una planta dicotiledónea que se denomina como pseudocereal, puesto que produce granos tipo cereal. Es una planta de crecimiento rápido y de las pocas especies que, sin ser pasto, utiliza la ruta C4 para la fijación de carbono. El amaranto puede crecer en climas calientes y templados donde el suministro de agua es limitado; es tolerante a condiciones áridas y suelos pobres, condiciones que son altamente adversas para el cultivo de cereales, se

han reportado rendimientos de 1 a 6 toneladas por hectárea, pudiéndose comparar con los rendimientos de otros cultivos.

Tabla 1. Composición química de las partes vegetativas de amaranto.

Análisis	Amaranto
Composición proximal ^a	
Humedad	86.9
Proteína cruda	0.5
Grasa	1.3
Fibra	2.6
Cenizas	5.2
Extracto libre de nitrógeno	5.2
Minerales ^b	
Calcio	267.0
Fósforo	67.0
Sodio	-
Potasio	411.0
Hierro	3.9
Vitaminas ^b	
A (UI) ^c	6100
Tiamina	0.1
Riboflavina	0.2
Niacina	1.4
C	80.0

a= g/100g de materia comestible, b= mg/100g de materia comestible, c UI= unidades internacionales, Paredes López, O, 1994.

Ahora se sabe que el grano de amaranto contiene proteínas con un mejor contenido de aminoácidos esenciales que otros cereales y leguminosas (Paredes López, 1994). Durante las últimas dos décadas el amaranto ha sido estudiado tanto agrónomicamente como nutricionalmente. Este interés comenzó desde que en 1973 cuando Downton reportó que las proteínas del grano de amaranto contenían 2 o 3 veces mayor concentración de lisina en comparación con el arroz, trigo y maíz.

En el amaranto han sido descritas 2 tipos de albúmina (Martínez y cols. 1997) entre las que se encuentran la albúmina 1, la cual es extraída con agua y/o soluciones salinas y la albúmina 2 que es extraída con agua después de que en la harina se han extraído mediante soluciones salinas la albúmina 1 y la globulina (tabla 2).

Tabla 2. Fracción de proteínas de *A. hypochondriacus* determinadas por distintos métodos.

Procedimiento	Fracción*					
	Albumina	Globulina	Alb+Glo	Prolaminas	Glutelinas	Residuo
Mitchell (1984)	48.9	13.7		7.2	8.5	21.7
Padhye & Salunkhe (1977)			w 56.9	1.6	22.4	8.5
			nw 59.4	1.0	29.4	12.6
Padhye & Salunkhe (1977)	65.0	17.0		11.0	7.0	nd
Osborne (1904) W			39.5	3.2	39.2	18.1
			29.2	1.3	40.3	29.2
Landry & Moreaux (1990) A	8.5	38.5		9.1	29.1	14.8
	19.2	18.1		2.0	42.3	18.4
Landry & Moreaux (1990) B			57.3	1.4	25.8	12.1
Osborne (1924)	50.0	15.6	51.6	1.2	42.2	2.8
				2.0	30.4	2.0

Nota: Alb+Glo= albumina + globulina; w = ceroso, nw= no ceroso; W= toda la harina, D= harina desgrasada; A= procedimiento A, B= procedimiento B. nd = no determinado. *g/100g de proteína. Paredes López, O 1997.

El amaranto es una de las pocas especies vegetales de las cuales se pueden consumir las hojas y el grano, las principales especies de definen en la tabla 3.

Tabla 3. Especies de amaranto, origen, uso y sabor.

Especie	Tipo	Color del grano	Uso	Sabor
A. cruentus	Mexicano	Dorado	Reventado Panificaciócereal. Crepas, cereal	Dulce Tostado
	Africano	Café		
	Guatemala	Café	Crepas	Nuez
A. hypocondriacus	Mercado	Dorado	Versatilidad	Muy dulce
	Nepal	Dorado	Reventado	Poco dulce
A. hybridus	Prima	Blanca, negra	Crepas	Dulce, nuez
A. caudatus		Café	Potajes	Trigo

Paredes López, O 1997.

Como ya se mencionó los granos de amaranto poseen un alto contenido de lisina, el cual es un aminoácido esencial para la nutrición del hombre; el contenido de este aminoácido oscila en general entre 4.6 y 6.4 gramos por 100 gramos de proteína, y tiene también cantidades importantes de señalar de otros aminoácidos como se observa en la tabla 4.

Tabla 4. Aminoácidos esenciales del grano de amaranto, y recomendación de ingesta de la FAO.

Aminoácido	A. Hypochondriacus (g/100gproteína)	FAO (IDR)	
		Adultos	Niños
Cys	2.0-3.9		
Ile	2.8-3.8	1.3	4.6
Leu	5.0-5.8	1.9	9.3
Lys	3.2-6.0	1.6	6.6
Met	0.6-1.6		
Phe	3.8-4.5		
Thr	2.6-4.3	0.9	4.3
Trp	1.1-4.0	0.5	1.7
Tyr	3.1-4.0		
Val	3.2-4.2	1.3	5.5
Met+Cys	2.6-5.5	1.7	4.2
Phe+Tyr	6.9-8.5	1.9	7.2

Paredes López, O 1997.

2.2 Hidrolizados proteicos.

El material de partida utilizado para la obtención de los hidrolizados proteicos puede ser de origen animal, vegetal o bacteriano. Las características del hidrolizado vendrán determinadas por el uso que se les quiera dar, el grado y tipo de hidrólisis va a determinar el resto de las propiedades del hidrolizado. El grado de hidrólisis es la propiedad fundamental de un hidrolizado, se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación con la proteína original, esta determinado por la concentración del sustrato, la relación enzima/sustrato, el

tiempo de incubación y las condiciones fisicoquímicas tales como el pH y la temperatura.

Hoy en día los hidrolizados que se producen para uso en alimentación se pueden agrupar en: Hidrolizados con bajo grado de hidrólisis, entre el 1 y 10 % para la mejora de las propiedades funcionales, hidrolizados con grados de hidrólisis variable para su uso como saborizantes y por último, hidrolizados extensivos, con grado de hidrólisis superior al 10%, para su uso en alimentación especializada (dietas médicas).

Estudios de Tovar y cols. (2009) sobre la influencia de la hidrólisis, en proteínas del grano de amaranto, en la modificación de las propiedades funcionales han mostrado que el grado de hidrólisis en combinación con el pH influye en la capacidad de espumado y emulsificación.

2.3 Propiedades funcionales.

Generalmente las proteínas tienen una gran influencia sobre los atributos sensoriales de los alimentos. La funcionalidad de las proteínas alimentarias se define como aquellas propiedades físicas y químicas que derivan del comportamiento de las proteínas en los sistemas alimenticios durante el procesamiento, el almacenamiento, la preparación y el consumo. Entre las propiedades físicas y químicas que gobiernan la funcionalidad de las proteínas se incluyen el tamaño, la forma, la composición y secuencia de aminoácidos, la carga neta y distribución de las cargas, el cociente hidrofobia/hidrofilia, las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria, el grado de flexibilidad-rigidez y la capacidad de interaccionar, o repeler otros componentes. Debido a que las proteínas poseen diversas propiedades físicas y químicas es difícil determinar el papel que cada una de ellas juega en una determinada propiedad funcional (Fennema, 1993).

2.3.1. Solubilidad.

Las propiedades funcionales de las proteínas se ven frecuentemente afectadas por la solubilidad proteica. La solubilidad de una proteína es la manifestación termodinámica del equilibrio entre las interacciones de proteína-proteína y proteína-disolvente.

Las interacciones que influyen de forma más importante en las características de solubilidad de las proteínas son las hidrofóbicas e iónicas. Las interacciones hidrófobas promueven la asociación proteína-proteína y disminuyen la solubilidad en tanto que las iónicas promueven las interacciones proteína-agua y aumentan la solubilidad. Los restos aminoacídicos con cadenas laterales ionizables introducen dos tipos de fuerzas repulsivas entre las moléculas proteicas en disolución. El primero está constituido por la repulsión electrostática entre moléculas proteicas; debido a la posesión de una carga neta positiva o negativa, a cualquier pH distinto del isoeléctrico; el segundo implica la repulsión entre las capas de hidratación en torno a los grupos ionizados (Fennema, 1993).

2.3.2. Propiedades emulsificantes.

Las propiedades físicas y sensoriales de una emulsión estabilizada por una proteína dependen del tamaño de las gotas de fase dispersa formadas y el área interfacial global lograda.

La estabilidad de una emulsión se ve influida por la cantidad de proteína adsorbida en la interfase grasa-agua. Para determinar la cantidad de proteína adsorbida, se centrifuga la emulsión, se separa la fase acuosa, se lava repetidamente la fase grasa se centrifuga para eliminar la proteína débilmente adsorbida. La cantidad de proteína adsorbida a las partículas de la emulsión se determina por diferencia entre la proteína total inicialmente presente en la emulsión y la cantidad que se haya en los líquidos lavados de la fase dispersa.

La capacidad emulsificante es el volumen (mL) de aceite que puede ser emulsificado por gramo de proteína antes de que se invierta la fase.

Las propiedades de las emulsiones estabilizadas por las proteínas se ven afectadas por diversos factores como el pH, la fuerza iónica, la temperatura, la presencia de agentes tensoactivos de bajo peso molecular y azúcares (Fennema, 1993).

2.3.3 Propiedades espumantes.

Las espumas están formadas por una fase continua acuosa y una fase gaseosa (aire). Las espumas estabilizadas por proteínas suelen formarse por burbujeo, batido o agitación de una solución proteica. Las propiedades espumantes de las proteínas derivan de su capacidad de formar una película delgada y tenaz en las interfases gas-líquido, lo que permite la incorporación y estabilidad de múltiples burbujas de aire.

El poder espumante suele aumentar con la concentración de proteína, hasta alcanzar un valor máximo. La capacidad espumante de una proteína es el área interfacial que puede ser creada por ella, por otra parte la estabilidad de la espuma hace referencia a la capacidad de estabilizarla frente a esfuerzos mecánicos o gravitatorios (Fennema, 1993).

2.4 Superficie de respuesta

El objetivo de la superficie de respuesta es describir la respuesta a los factores de tratamiento.

La ecuación de respuesta se puede mostrar como una superficie cuando los experimentos investigan el efecto de dos factores cuantitativos, como los efectos de temperatura y presión en la tasa de una reacción química, o en el caso de este trabajo grado de hidrólisis y pH en la formación de espumas y emulsiones.

La superficie de respuesta permite inspeccionar, de manera visual, la respuesta para cierta zona de los niveles de los factores de interés y evaluar su sensibilidad a los factores de tratamiento.

Las superficies de respuesta también se pueden utilizar en estudios analíticos de procesos fundamentales, por ejemplo, suelen usarse en las ciencias biológicas para investigar la influencia mutua de los factores sobre la variable de respuesta como la interacción entre el nitrógeno y el fósforo en el crecimiento de las plantas.

El diseño de superficies de respuesta y la estrategia de análisis supone que la media de la variable de respuesta μ_y esta en función de los niveles de factores cuantitativos representados por las variables x_1, x_2, \dots, x_k . Los modelos polinomiales se usan como aproximaciones prácticas a la función de respuesta verdadera o real. En general, la función real se desconoce y las funciones polinomiales con frecuencia proporcionan buenas aproximaciones en zonas relativamente pequeñas de los niveles de los factores cuantitativos.

Los modelos polinomiales comúnmente empleados para el análisis de superficies de respuesta son el modelo lineal o de primer orden y el modelo cuadrático o de segundo orden. El modelo de primer orden para dos factores es:

$$\mu_y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2$$

y el modelo de segundo orden es:

$$\mu_y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2$$

2.5 Antioxidantes.

Diversas rutas metabólicas producen especies llamadas radicales libres, que incluyen la fosforilación oxidativa, la fagocitosis, el metabolismo de ácidos grasos, la síntesis y degradación de biomoléculas. Los radicales libres en sistemas biológicos incluyen especies reactivas de oxígeno como: anión superóxido (O_2^{*-}), radical hidropéroxido (HO_2^*), peróxido de oxígeno (H_2O_2) e hidroxilo (OH^*) y especies reactivas de nitrógeno por ejemplo óxido nítrico (NO^*) y dióxido de

nitrógeno (NO^{\bullet}_2). Por su parte, el cuerpo humano ha diseñado diversos mecanismos antioxidantes que pueden atacar a diferentes niveles en el proceso de oxidación. Cuando los radicales libres son generados en exceso o cuando las células carecen de defensas, las biomoléculas son dañadas mediante un proceso llamado estrés oxidativo. Este proceso parece estar involucrado en el envejecimiento celular y asociado a enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades neurológicas degenerativas entre otras.

Un antioxidante se define como sustancias sintéticas o naturales que previenen o retardan el deterioro de las moléculas debido a la presencia de oxígeno produciéndose radicales libres por reacción en cadena.

Tabla 5. Clasificación de los antioxidantes de acuerdo a su sistema de defensa para el daño oxidativo.

Sistema antioxidante	Antioxidantes	
Antioxidantes primarios:	Enzimas:	
<ul style="list-style-type: none"> Descomposición no radical de hidroperóxido y peróxido de hidrógeno. Secuestro de iones metálicos catalíticos por quelación. Remoción o depuración de ROS 	<ul style="list-style-type: none"> Catalasa Glutación peroxidada Superóxido dismutasa 	
	Proteínas:	
	<ul style="list-style-type: none"> Transferrina, ferritina Ceruloplastina Albúmina Metalotioneinas 	
Antioxidantes reductores de radicales de libres primarios o secundarios. Reducen radicales libres para inhibir la cadena de iniciación o romper la cadena de propagación.	a)Hidrofílicos	b)Lipofílicos
	<ul style="list-style-type: none"> Vit C Ácido úrico Bilirrubina Albúmina 	<ul style="list-style-type: none"> Vit E Vit A carotenoides Melatonina Estrógenos
Enzimas reparadoras y de síntesis de novo o terciarios. Reparar el daño y reconstituyen las biomoléculas.	<ul style="list-style-type: none"> Enzimas reparadoras de lípidos Enzimas reparadoras de proteínas 	

- Enzimas reparadoras de ADN
-

2.5.1 Métodos de cuantificación de actividad antioxidante.

La actividad antioxidante se define como la capacidad de un compuesto de inhibir la degradación oxidativa.

Hoy en día se conocen numerosos métodos para determinar la capacidad antioxidante, estos métodos se dividen en dos grupos: *in vitro* e *in vivo*.

Los métodos *in vitro* se dividen en cinco grupos de acuerdo a la clasificación de Böhm y Schlesier, (2004): a) métodos para la detección de la peroxidación de lípidos, b) métodos con generación de radicales, c) métodos con pruebas fluorimétricas, d) métodos de fotoquimioluminiscencia, e) métodos electroquímicos, algunos ejemplos son: ensayo de la actividad antioxidante para reducir al Fe^{3+} (FRAP) en plasma, ensayo del potencial total atrapador de radicales peroxilos (TRAP), ensayo de lipoperoxidación (FOX), capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), capacidad antioxidante equivalente al TROLOX (TEAC), entre otros.

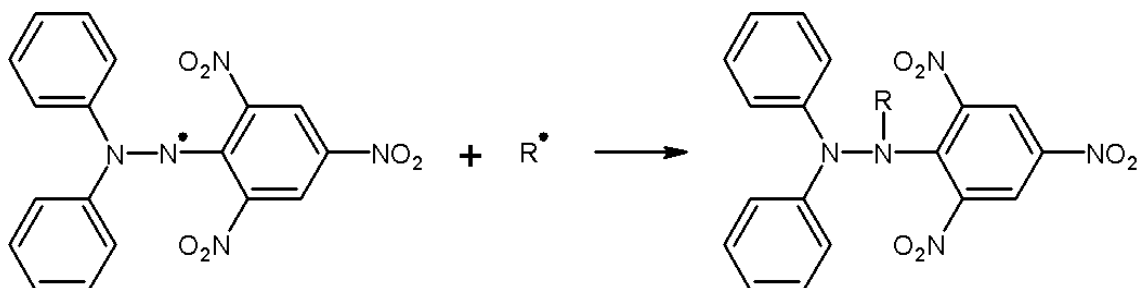
Por su parte los métodos *in vivo* se pueden dividir en dos: métodos *in vivo* y *ex vivo*, en el primero se utilizan modelos vivos (ej. ratas) y en el segundo líneas celulares de diferentes tipos de cáncer.

De los métodos *in vitro* se encuentran los siguientes métodos:

2.5.2. Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•).

Método espectrofotométrico basado en la capacidad de las muestras ensayadas de reducir al radical DPPH• (Huang y cols. 2005). Este radical se encuentra en forma comercial. Presenta un máximo de absorción UV-visible a 517 nm donde su color es púrpura y al adición de un neutralizador de radicales libres o un compuesto antioxidante, el DPPH• se reduce pasando a un color amarillo.

El porcentaje de DPPH remanente es proporcional a la concentración de antioxidante y la concentración de antioxidante que provoca una disminución del 50% en la concentración inicial de DPPH se define como IC₅₀.



Radical DPPH[•](color morado)

forma reducida (color amarillo)

Figura 1. Reacción de reducción de DPPH[•].

2.5.3. Método de decoloración del radical catiónico 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico (ABTS^{•+})).

El método emplea el compuesto ABTS y pertenece a la clasificación de métodos por generación de radicales y es un método espectrofotométrico. Se basa en un proceso previo de oxidación del ABTS, que será reducido por un compuesto antiradical.

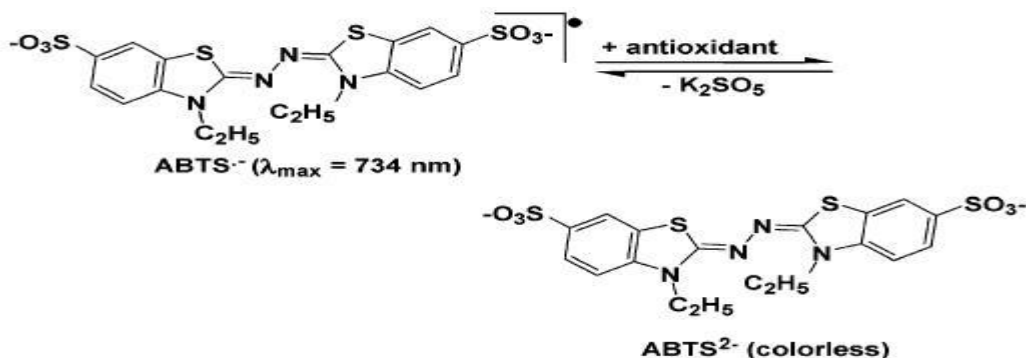


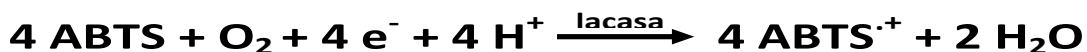
Figura 2. Reacción de reducción de radical 3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico (ABTS^{•+}).

En una versión mejorada del método original Miller y cols. (1993), el ABTS⁺ es generado por su oxidación producida con persulfato de potasio (K₂S₂O₈) obteniéndose al radical catiónico ABTS o el dicatión ABTS²⁺ (Reis y cols., 2005; Branchi y cols., 2005; Childs y cols., 1975; Solís y cols., 2005). Algunas de sus características fisicoquímicas más importantes son: estabilidad química elevada, soluble en agua, espectro de absorción UV-visible donde posee cuatro picos a longitudes de onda de 394, 414, 646 y 728 nm (Arnao y cols., 1996), no inhibe a las enzimas y no es tóxico (Childs y Bardsley, 1975).

Durante el proceso de oxidación del ABTS se presenta un cambio de coloración en la solución provocado por la formación de radicales ABTS⁺ que se caracterizan por poseer un color verde-azul intenso que absorbe en la región visible. Las propiedades espectrofotométricas del ABTS permiten llevar a cabo ensayos colorimétricos para determinar actividad enzimática. Su principal desventaja es el tiempo de formación de los RL, ya que se requiere un tiempo de reacción de 16 h.

2.5.4 Sistema ABTS/lacasa.

El Sistema ABTS/lacasa (Soriano y cols., 2008), del cual la principal característica es la utilización del compuesto ABTS para la formación del radical libre ABTS⁺ que actúa como un mediador entre la enzima y el sustrato, facilitando la acción de la enzima.



2.4.5 Ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBA).

El ensayo con el TBA es el método que más se utiliza para la detección de peroxidación de lípidos. El malondialdehído es un compuesto que se forma como parte del proceso de oxidación de ácidos grasos insaturados. Es un método que se basa en una reacción entre el malondialdehído y el TBA que da como resultado un

cromóforo de color rosa detectable a una longitud de onda de 532 nm. Su principal desventaja es que el TBA puede formar especies coloridas con sustancias como los alcanos, proteínas, sacarosa y urea, causando interferencia en el ensayo. Aunque, dada la complejidad del proceso, todavía no se ha llegado a conocer por completo el mecanismo de reacción entre el TBA con el malondialdehído. Es una de las técnicas más utilizadas para medir la autooxidación y los cambios que esta provoca, en alimentos y sistemas biológicos, factores tales como el aire (oxígeno), calor, luz, radiaciones ionizantes e iones metálicos (Cu^{+2} , Fe^{+2} , etc.).

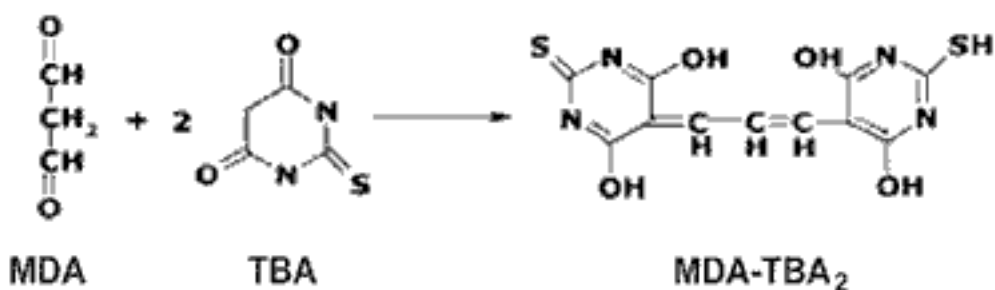


Figura 3. Reacción del ensayo con el TBA (reacción posible)

2.5.5 Péptidos antioxidantes.

Los péptidos se definen como un compuesto que tiene la posibilidad de regular las funciones biológicas en el organismo humano ya que, al ser consumidos se absorben por los enterocitos del intestino, siendo liberados posteriormente dentro de los espacios inter-intestinales y transferidos a través de las paredes capilares hacia la sangre, donde liberan su actividad biológica benéfica.

Los péptidos han sido aislados de fuentes animales así como de fuentes vegetales. Realizando la hidrólisis enzimática de proteínas que tienen características comunes, independientes a la fuente proteínica de origen, como por ejemplo: sus cadenas son de 2 a menos de 100 aminoácidos se han aislado de diferentes fuentes proteicas y presentaron diversas actividades biológicas como la inhibición de la peroxidación y eliminación de radicales libres producidos *in vivo* (Hook y cols., 2001). De igual manera, se han reportado que algunos aminoácidos y sus derivados como la cisteína, histidina, triptófano, lisina, arginina, leucina,

valina y β -hidroxiltriptofano, etc., tienen actividad antioxidante (Uchida y Kawakishi, 1992). Así como polipéptidos de peso molecular bajo que contienen histidina, triptófano, prolina y tirosina que también han presentado capacidad antioxidante (tabla 6).

Tabla 6. Péptidos obtenidos a partir de fuentes naturales y su composición.

Fuente	Composición
Capelin (pez) (Amarowicz y cols, 1999)	5-16 aminoácidos. Val, Leu, Pro, HIs y Tir
Soya (Hua y cols, 1996)	5-16 aminoácidos Pro, Tir, His, Lis y Trp
Clara de huevo (Chen y cols, 2003)	Tripéptido Ala e HIs
Abadejo de Alaska (Se y cols, 2003)	13 y 16 aminoácidos Gli, Pro, HIs e Ile
Alfalfa (Zhenguim y cols, 2008)	2 y 6 aminoácidos His, Tir, Met y Cis

III. Trabajos Previos

En los últimos años se han reportado trabajos en los que se proponen a las proteínas de diversas especies de amaranto como una fuente de antioxidantes, y más aun péptidos antioxidantes.

Como en el trabajo que reporto Valeria y cols. en 2009 , en el que se investigaron aislados de proteína y fracciones de proteína (mediante hidrólisis enzimática) de albúmina, globulina y glutelina de la especie de amaranto: *Amaranthus mantegazzianus*, en donde se encontró que el efecto de la hidrólisis incremento la actividad antioxidante, especialmente en la muestra con grado de hidrólisis mayor, de las diversas proteínas estudiadas.

Por otra parte otro estudio de Zhengjun y cols en 2008, evidencia la actividad antioxidante de hidrolizados de proteína obtenidos de la hoja de alfalfa, en este estudio se concluyó que los valores de actividad antioxidante más altos estaban relacionados con péptidos de bajo peso molecular.

Un estudio más de Qian y cols. en 2009, determinó en hidrolizados de proteína de plasma de porcino propiedades funcionales y actividad antioxidante, de lo que concluyeron un aumento en las propiedades funcionales, por su parte la actividad antioxidante como los estudios mencionados anteriormente, aumentó conforme se incrementó el grado de hidrólisis.

En todos los estudios mencionados resaltan la importancia del grado de hidrólisis ya que con el aumento de éste se obtienen péptidos de bajo peso molecular. En todos ellos encontraron agentes antioxidantes provenientes de diversas proteínas y diversas condiciones.

IV. JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento no existe una investigación extensa sobre el estudio de las propiedades funcionales de hidrolizados de las proteínas del amaranto. Solo se han reportado dos estudios con este objetivo en globulina, con lo cual se ha indicado que las propiedades funcionales de los hidrolizados presentan un gran potencial para su uso como ingredientes en la preparación de alimentos, ya que inciden en las propiedades físicas y organolépticas de muchos alimentos; además de su aporte nutricional.

El conocimiento de la relación entre proteína-estructura en el alimento puede ayudar a esclarecer aquellos mecanismos involucrados en la funcionalidad de las proteínas, de tal manera que un cambio en la estructura nativa y biológica conducirá a un impacto significativo en el alimento.

La selección de la enzima utilizada para la hidrólisis determinará que fracciones peptídicas se formarán debido a la especificidad de la misma y como resultado se obtendrán hidrolizados con diferente funcionalidad tecnológica. Lo importante será determinar un grado óptimo de hidrólisis para mejorar dichas propiedades funcionales.

Se ha observado que los hidrolizados de proteína potencian diversas características funcionales, tales como viscosidad, alta solubilidad, alta capacidad espumante y emulsificante, lo que les concede ventajas para el uso en muchos productos alimenticios, respecto a las proteínas originales. Adicionalmente a estas propiedades, los hidrolizados pueden presentar actividad antioxidante debido a la liberación de péptidos. De esta manera se obtendrían espumas, emulsiones o geles con esta actividad biológica, lo cual resultaría en la obtención de materias primas de valor agregado obtenidas a partir de amaranto con lo cual se podría incentivar este cultivo y encontrar aplicaciones en el diseño de alimentos funcionales.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antioxidante de espumas y emulsiones de hidrolizados de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.).

Objetivos específicos:

1. Evaluar las condiciones de hidrólisis para la obtención de hidrolizados con grado de hidrolisis bajo, medio y alto.
2. Caracterizar la solubilidad y actividades espumante y emulsificación de hidrolizados obtenidos con pepsina, de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto (*A. hypochondriacus* L.) con grado de hidrólisis baja, media y alta.
3. Caracterizar la composición peptídica de los hidrolizados de albúmina 1 y globulina con diferentes grados de hidrólisis, con base en el peso molecular relativo.
4. Aplicar la metodología de superficie de respuesta para la optimización de las propiedades de espumado y emulsificación de hidrolizados de albúmina 1 y globulina.
5. Evaluar la actividad antioxidante de la mejor condición de obtención de espumado y emulsificación de albúmina 1 y globulina.

VI. HIPÓTESIS

La hidrólisis enzimática de la albúmina 1 y globulina de amaranto, no sólo mejoran las propiedades de solubilidad, espumado y emulsificación, sino que además influye en el desarrollo de propiedades biofuncionales como la actividad antioxidante.

VII. MATERIALES Y METODOS.

En la figura 4 se muestra el esquema general de trabajo que se siguió durante este proyecto.

7.1. Molienda y desgrasado de los granos de amaranto.

Los granos se molieron mediante un molino de café Brown y la harina obtenida se pasó por un tamiz con un tamaño de malla de 0.250mm (No. 60) y se procedió al desgrasado. La harina de amaranto se desgrasó utilizando acetona (5mL/g) en agitación constante a temperatura ambiente durante 16 h. (3 veces), después se filtró al vacío con 1 lavado de éter. La harina resultante se depositó en la campana de extracción con el fin de que se evaporara todo el solvente. Posteriormente, se pasó por un tamiz con un tamaño de malla de 0.250mm (No.60) y se almacenó a 5°C.

7.2. Extracción de albúmina 1 y globulina.

Las proteínas a estudiar fueron extraídas por el método Padhye y Salunke, 1977 (Figura 5). Se pesaron 50 gramos de harina desengrasada a los cuales se le agregó 300 mL de Na₂SO₄ al 5% (0.04M) se mantuvo en agitación durante 30 min. a 5°C, después de este tiempo se centrifugó durante 20 min. a 13,000xg. La mezcla se separó en sobrenadante y en residuo. Al residuo se le agregó 200 mL de Na₂SO₄ al 5% (0.04M) y se mantuvo en agitación durante 30min. y se centrifugó 20 min. a 13,000 x g, al sobrenadante que se obtiene se mezcló con el anterior y se precipitó con (NH₄)₂SO₄ al 50, 70 y 100% de saturación centrifugando en cada saturación 20 min. 13,000xg. Al precipitado obtenido al final de las 3 saturaciones se sometió a una diálisis con agua desionizada durante 24h. con 4 cambios de agua y se centrifugó 20 min. a 13,000 xg.

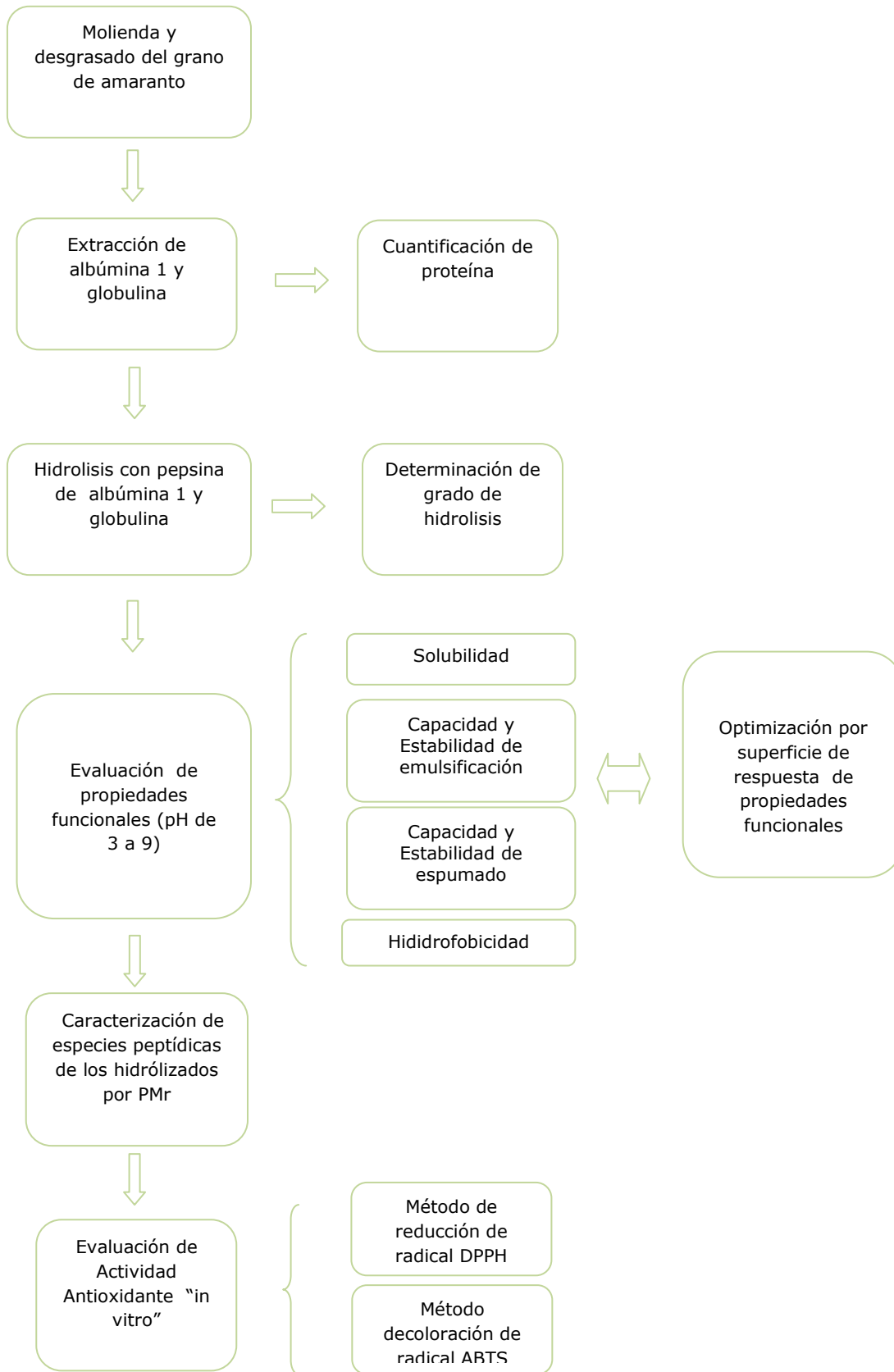


Figura 4. Diagrama de flujo general de trabajo.

El sobrenadante que se obtuvo es la fracción de proteína soluble en agua, es decir la Albúmina 1; el residuo se dializó con Na_2SO_4 al 10% durante 24h. se centrifugó 20 min. a 13,000 xg y el sobrenadante corresponde a la fracción de proteína soluble en soluciones salinas, es decir la Globulina.

7.2.1 Cuantificación de proteína.

A las fracciones de proteína obtenidas se les determinó concentración mediante el método de Bradford (1976), método espectrofotométrico el cual se basa en la unión de la proteína al colorante azul de Comassie G-250, unión que absorbe a una longitud de onda de 595nm.

Se agregó 0.1 mL de albúmina 1 y/o globulina a un tubo de ensaye, posteriormente se agregaron 5 mL del reactivo azul de Coomasie G-250, se procedió a mezclar en vortex y finalmente se midió la absorbancia a 595nm. Se utilizó un blanco de de NaCl 0.15 M.

Para el cálculo de proteína se utilizó una curva estándar con Albúmina bovina (anexo 1).

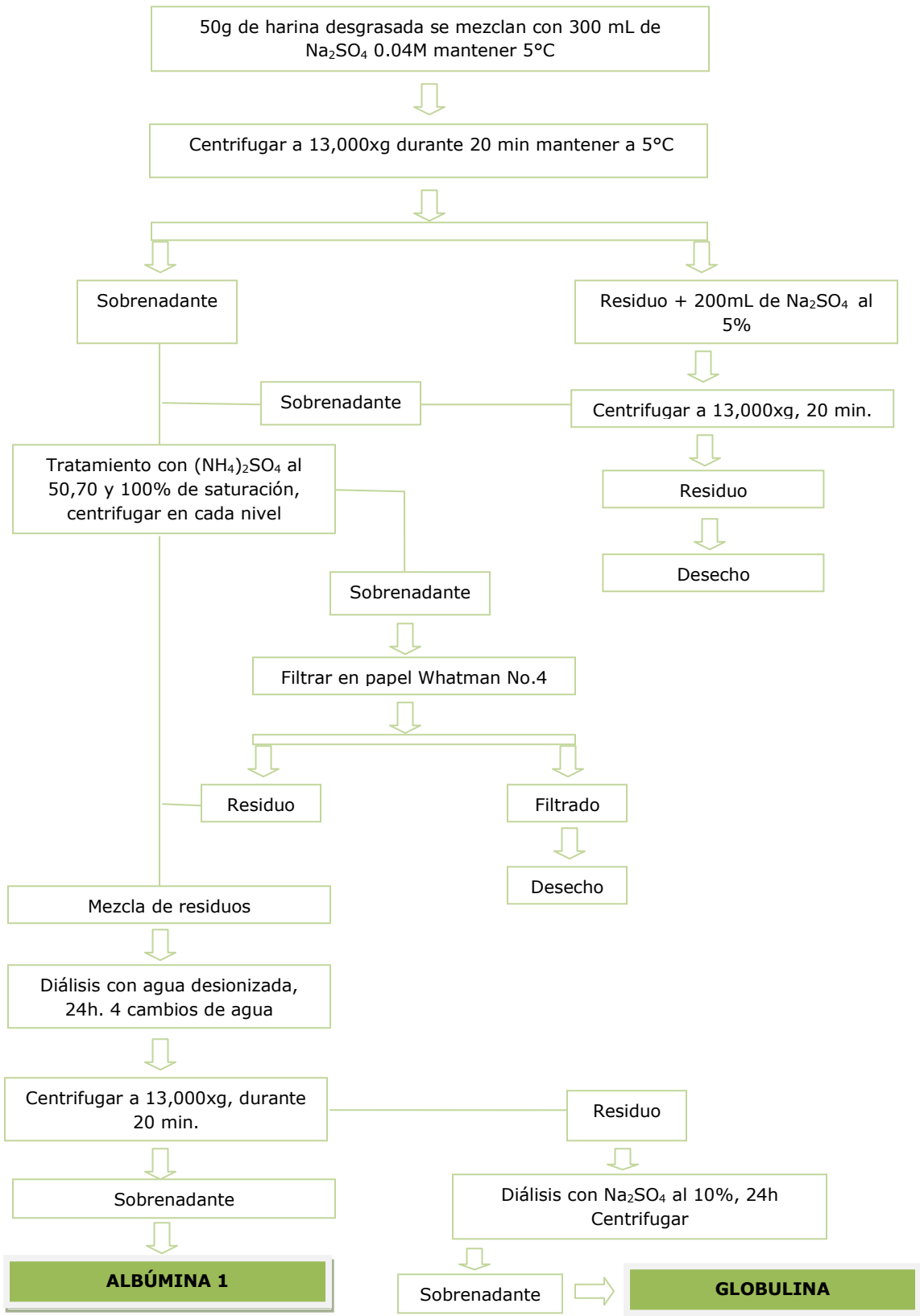


Figura 5. Diagrama de extracción de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto (Padhye y Salunke, 1977).

7.3. Hidrólisis enzimática de Albúmina 1 y Globulina con pepsina.

Se llevo a cabo mediante el método de Li y cols. (2005), utilizando pepsina como enzima proteolítica, a una concentración de 756 U/mL, es una peptidasa, la cual es una enzima digestiva que degrada las proteínas en el estomago.

La hidrólisis se llevó a cabo añadiendo 600 μ L Albúmina 1 o Globulina (5mg/mL), 280 μ L de buffer de HCl-NaOH 0.2M, pH = 2, esta mezcla se incubo a 37°C por 5 minutos, posteriormente se agregó pepsina 756U/mL en solución amortiguadora de HCl-NaOH 0.2M, pH = 2, de la cual se obtiene una relación enzima/sustrato 50.4 U/mg. La hidrólisis se llevó a cabo a diversos tiempos hasta obtener los grados de hidrólisis (GH) 2, 5 Y 10% finalmente se detuvo la reacción añadiendo 2 gotas de NaOH 1N.

7.3.1 Determinación de grado de hidrólisis (GH).

Se determinó mediante el método de Adler-Nissen (1979), el cual se basa en la cuantificación de grupos amino libres, mediante la reacción de los grupos amino libres que resultan de la hidrólisis con el ácido trinitrobenzen-sulfónico (TNBS).

Primero se procedió a diluir ambas fracciones de proteína (1:10), se mezcló en un tubo de ensaye 125 μ L de la proteína hidrolizada, 1mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.5M pH=8.2 y 1 mL de solución de ácido trinitrobenzen-sulfónico al 1% en agua. Se incubó en la oscuridad a 50°C durante 1h. Posteriormente se añadió 2 mL de HCl 0.1 N para detener la reacción y se mantuvo a temperatura ambiente por 30 min para finalmente leer la absorbancia a una longitud de onda de 340nm.

El GH se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%GH = (h/h_t) \times 100$$

Donde h es el número de enlaces peptídicos hidrolizados y h_t el número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína nativa (albúmina 1 o globulina).

Ambos h y h_t son expresados en meq L-Leucina/g proteína, mediante una curva estándar de Leucina (anexo 2). El número total de grupos amino fue determinado en albúmina y globulina mediante una hidrólisis total usando HCl 6N durante 24 h a 120°C.

7.4 Determinación de propiedades funcionales de los hidrolizados de albúmina 1 y globulina.

Se determinaron las propiedades funciones: estabilidad de emulsión, capacidad de emulsión, estabilidad de la espuma, capacidad de espumado y solubilidad, estas se evaluaron en un rango de pH 3 a 9.

7.4.1 Capacidad de emulsificación.

Se mezcló en un tubo para Ultrarax 1 mL de hidrolizado ya sea de albúmina y/o globulina (5%p/v) con 1 mL de aceite comercial, después se procedió a homogenizar a 20,000 rpm en Ultrarax por 1 minuto y se midió la altura de la emulsión.

La capacidad de emulsión se calculo utilizando la siguiente ecuación:

$$1) \% \text{ Cap.de emulsión} = \frac{\text{altura de la capa de emulsificada}}{\text{altura del contenido del tubo}} \times 100$$

7.4.2 Estabilidad de emulsión.

Se mezcló en un tubo para Ultrarax 1 mL de hidrolizado ya sea de albúmina y/o globulina (5%p/v) con 1 mL de aceite comercial, después se procedió a homogenizar a 20,000 rpm en Ultrarax por 1 minuto y se midió la altura de la emulsión, para continuar se centrifugó a 1,500 xg durante 5 minutos al finalizar este tiempo se midió la altura de la emulsión, se continuó poniendo la emulsión

en un baño maría a 80°C por 20 minutos, se enfrió en la llave de agua y finalmente se centrifugó a 1,500 xg por 5 minutos y se midió la altura del remanente.

La estabilidad de la emulsión se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$1) \% \text{ Est. De emulsión} = \frac{\text{altura del remanente de la emulsión}}{\text{altura de la capa original de emulsión}} \times 100$$

7.4.3 Capacidad de espumado.

Se tomó 1mL de muestra de hidrolizado ya sea de albúmina y/o globulina (5%p/v) a pH "x", se homogenizó a 13,500 rpm en Ultrarax por 1 minuto, posteriormente se midió la altura de la espuma, con la finalidad de calcular el volumen de la misma.

La capacidad de espumado se obtuvo mediante las siguientes ecuaciones:

Se tomó en cuenta que la altura de tubo=13cm, diámetro=1.2cm y radio=0.6cm

$$1) \text{ Volumen} = \pi \cdot r^2 \cdot h$$

Se consideró un volumen inicial de la fase líquida de 1

$$2) \% \text{ Cap. de espumado} = \frac{\text{vol. de espuma después de homogenizar}}{\text{vol. Inicial de la fase líquida}} \times 100$$

7.4.4 Estabilidad de espumado.

Se tomó 1mL de muestra de hidrolizado ya sea de albúmina y/o globulina (5%p/v) a pH "x", se homogenizó a 13,500 rpm en Ultrarax por 1 minuto, posteriormente se midió la altura de la espuma, con la finalidad de calcular el

volumen de la misma, se procedió a dejarlo reposar 30 minutos para finalmente volver a medir la altura de la espuma y posteriormente el volumen.

La estabilidad de espumado se calculó con la siguiente ecuación:

$$1)\% \text{ Est. de espumado} = \frac{\text{vol. de espuma después de 30 minutos}}{\text{vol. de espuma después de homogenizar}} \times 100$$

7.4.5 Solubilidad.

Para determinar la solubilidad a los hidrolizados se midió 1mL de hidrolizado de albúmina 1 y/o globulina (5%p/v), se mantuvo en agitación constante durante 30 minutos, se centrifugó a 10000 xg durante 30 minutos, finalmente se determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford (método descrito en la sección 6.2.1).

7.4.6 Superficie de Hidrofobicidad.

La superficie de hidrofobicidad de albúmina 1, globulina y sus respectivos hidrolizados se determinó mediante un método espectrofotométrico de acuerdo a Kato y cols. (1984). El cual se fundamenta en la unión de los grupos hidrofóbicos con dodecil sulfato de sodio (SDS). Para lo cual se prepararon dispersiones de las muestras al 0.1% p/v en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 7.0 (ajustando el pH de 3 a 9). Se tomó una alícuota de 1 mL de la dispersión y se mezcló con 100 µL de SDS (0.7 mM). La mezcla se dejó reposar durante 30 min y se dializó en solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M, pH 6.0, por 24 h. Posteriormente 50 µL de la mezcla dializada se mezcló con 1 mL de cloroformo (para liberar el SDS unido a la muestra). A la mezcla se le agregó 250 µL de azul de metileno 0.0024% p/v seguido de agitación en vortex durante 2 min y se centrifugó a 2500 rpm por 10 min. La concentración de SDS que se unió a la muestra se determinó a 655 nm, previa elaboración de una curva patrón utilizando albúmina bovina sérica (anexo 3).

7.5 Caracterización de especies peptídicas de los hidrolizados por PMr.

Los hidrolizados de albúmina y/o globulina obtenidos se hicieron pasar por una columna de filtración en gel sephadex G-200 con un rango de fraccionamiento de 5 a 600 KDa, se equilibró con una solución amortiguadora de fosfatos que consta de K_2HPO_4 32.5 mM, KH_2PO_4 , NaCl 0.4 M, 2-mercaptoetanol 20 mM y 0.02% de azida de sodio. La cual obtuvo una fuerza ionica de 0.5 y pH de 7.5.

Se determinó a la columna volumen vacío (V_0) y volumen total (V_t) utilizando azul dextrano (2mg/mL) y DNP alanina (0.5mg/mL).

Se inyectó un volumen de 500 μ L, se utilizó el mismo amortiguador de fosfatos para eluir con un flujo de 18 mL/h, colectando fracciones de 1.5 mL, en cada fracción se midió la absorbancia a una longitud de onda de 280nm.

Se seleccionaron las fracciones que dieron las mayores absorbancias y se determinó el peso molecular relativo mediante una curva patrón (anexo 3) utilizando los siguientes marcadores: trioglobulina (670 kDa), γ -globulina (158 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), mioglobulina (17 kDa) y vitamina B-12 (1.35 kDa).

7.6 Evaluación de actividad antioxidante.

Se evaluó la actividad antioxidante a los hidrolizados que resultaron ser los óptimos para cada propiedad funcional es decir capacidad y estabilidad de espumado y emulsificación.

7.6.1 Método de Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil DPPH*.

Para el método de Radical DPPH* (Shimada y cols., 1992) se tomaron 250 µL de los hidrolizados de albumina 1 que fueron mezclados con 1.5 mL de metanol. Se adicionaron 150 µL DPPH* en metanol 5 mM de y agitar. Se incubó por 45 min en la oscuridad. Se centrifugó a 10,000 xg por 10 min. Se midió la absorbancia a 517 nm. Se calculó la capacidad de los hidrolizados de reducir los radicales DPPH* mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{A_B - A_A}{A_B} \times 100$$

Donde:

A_A = abs. muestra

A_B = abs. blanco de reacción

El valor de % de inhibición obtenido de cada hidrolizado se transformo en equivalentes de glutatión (GSH), trolox y ácido gálico mediante una curva patrón para cada equivalente (anexo 5).

7.6.2 Método de decoloración de radical catiónico ABTS⁺.

En este método se mezclaron 7 mmol de ABTS⁺ con 2.45 mmol de persulfato de potasio en agua y se dejó reaccionar 16 horas hasta obtener una solución azul. La solución se diluyó en agua hasta que la absorbancia alcanzó un valor de 0.7 leído a 734 nm con un volumen total de 3 mL. Esta solución se mezcló con 30 µL de la muestra. La absorbancia se midió cada minuto por un tiempo total de 6 a 30°C. La capacidad de reducción de radicales se calculó utilizando la ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{1 - A_{6 \text{ min.}}}{0.7} \times 100$$

El valor de % de inhibición obtenido de cada hidrolizado se transformo en equivalentes de glutatión (GHS), trolox y ácido gálico mediante una curva patrón para cada equivalente (anexo 4).

7.7 Análisis Estadístico.

Los resultados de las propiedades funcionales y actividad antioxidante se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación múltiple de Tukey utilizando el programa Statgraphic.

7.7.1 Optimización utilizando la metodología de superficie de respuesta.

Se optimizaron las propiedades funcionales (a través de la aplicación del método de superficies de respuesta; se utilizó un diseño factorial mixto considerando 2 factores: GH con tres niveles (2, 5 y 10 %) y pH con siete niveles (3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9). El análisis se realizó utilizando el paquete estadístico SatatGraphics5.1.

VIII.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Hidrólisis de albúmina 1 y globulina.

En la tabla 7, se muestran los valores de tiempo requeridos para la hidrólisis de ambas fracciones de proteína (albúmina 1 y globulina) para lograr obtener los valores de grado de hidrólisis (GH) establecidos para el presente estudio. Se observó que para obtener un mayor GH se requiere de mayor tiempo de incubación y que la albúmina 1 es más susceptible a la acción de la pepsina ya que se requirió de un menor tiempo de digestión para lograr su hidrólisis, caso contrario a lo presentado por la globulina. Las condiciones de pH y temperatura utilizadas en la proteólisis fueron las óptimas para la enzima utilizada (pepsina) de acuerdo a la literatura (Bénitez y cols. 2008).

Tabla 7. Factores que influyen en la hidrólisis enzimática de las fracciones de albúmina 1 y globulina con pepsina para lograr el GH deseado.

Factores	Albúmina 1				Globulina	
Tiempo (h)	0.3	3	3.3	3	8	12
Temperatura (°C)	37				37	
pH	2				2	
E/S (U/g)	50.4				50.4	
GH (%*)	2	5	10	2	5	10

*g de proteína hidrolizada/100 g de proteína.

El GH es un parámetro que determina en gran parte las propiedades que puede presentar un hidrolizado enzimático, tan es así, que existe una clasificación de los mismos en base al % de GH. De acuerdo a trabajos reportados (Vioque y cols., 2001), las propiedades funcionales de las proteínas

mejoran cuando se lleva a cabo una hidrólisis limitada ($\text{GH} < 10\%$), por tal motivo en el presente trabajo se decidió establecer GH de 2, 5 y 10% para poder evaluar el comportamiento de las propiedades funcionales cuando se lleva a cabo la hidrólisis de las proteínas del grano de amaranto.

8.2 Propiedades Funcionales de hidrolizados de albúmina 1.

8.2.1 Capacidad y estabilidad de emulsión.

En el análisis de varianza (ANOVA), el GH, el pH, y su interacción mostraron tener un efecto significativo sobre la capacidad de emulsión, sin embargo para la estabilidad de la emulsión, no se logró observar que tuvieran un efecto significativo ($p < 0.05$).

La prueba de Tukey que corresponde a la capacidad de emulsión muestra 6 grupos significativamente diferentes ($p < 0.05$), siendo la interacción GH 2%(A2) y pH 6 la que presentó la mayor capacidad de emulsión, con un valor de $44.2 \pm 1.85\%$.

Para el caso de la estabilidad de emulsión GH de 2 y 5% se observó la mayor estabilidad, no habiendo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellas y la albúmina 1, por lo tanto para obtener una buena estabilidad de emulsión se requiere de $\text{GH} \leq 5\%$, ya que para el caso de los hidrolizados que alcanzaron un $\text{GH} = 10\%$ esta propiedad disminuyó ($p < 0.05$).

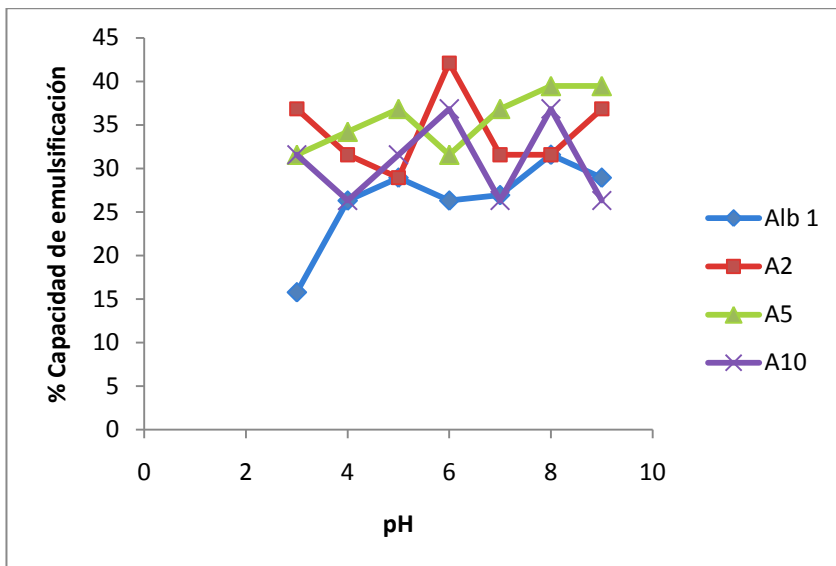


Figura 6. Capacidad de emulsificación de albúmina 1 (Alb 1) y sus hidrolizados a grados de hidrólisis 2, 5 y 10% (A2, A5, A10, respectivamente) a diferente pH.

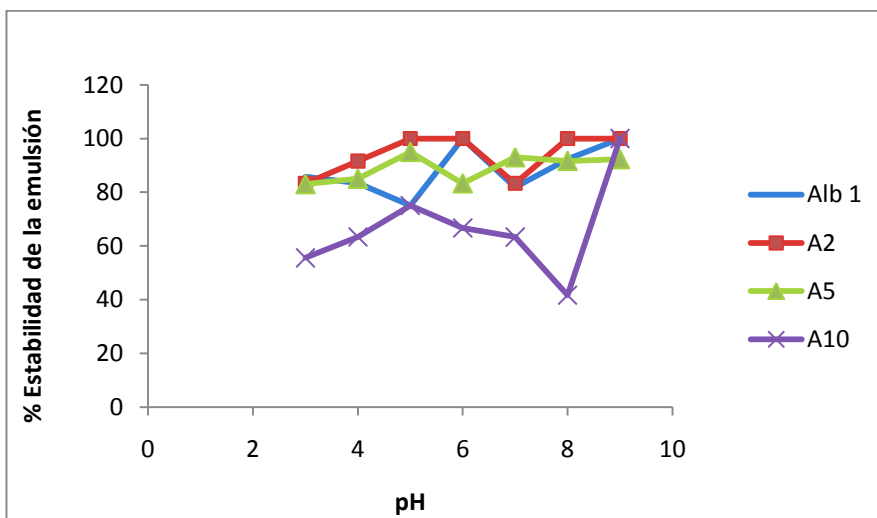


Figura 7. Estabilidad de emulsión albúmina1 (Alb 1) y sus hidrolizados a grados de hidrólisis 2, 5 y 10% (A2, A5, A10, respectivamente) a diferente pH.

8.2.2 Capacidad y estabilidad de espumado.

El análisis de varianza (ANOVA) mostró que para GH, pH y su interacción hay un efecto significativo tanto en la capacidad como en la estabilidad de espumado ($p < 0.05$) (Figuras 9 y 10).

La prueba de Tukey para la capacidad de espumado mostró 13 grupos significativamente diferentes ($p < 0.05$), siendo la interacción GH 10% (A10) con un pH de 7 la que presentó la mayor capacidad de espumar con un valor de $91.85 \pm 2.05\%$. Por otra parte la prueba de Tukey para la estabilidad de espumado mostró 13 grupos diferentes ($p < 0.05$) y la interacción que mostró mayor estabilidad fue la misma, es decir, a GH = 10% y pH 7 que presentó un valor de $95.2 \pm 6.7\%$.

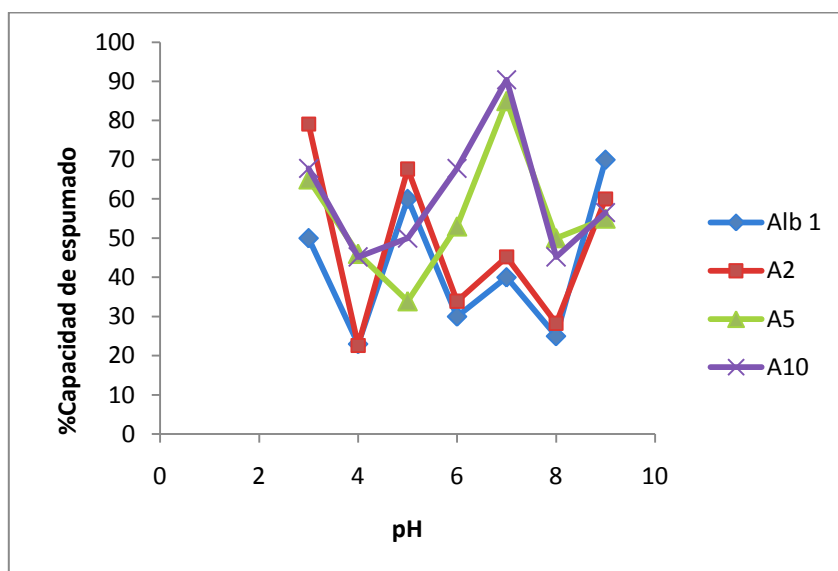


Figura 8. Capacidad de espumado de albúmina1 (Alb 1) y sus hidrolizados a grado de hidrólisis de 2, 5 y 10% (A2, A5, A10, respectivamente) a diferente pH.

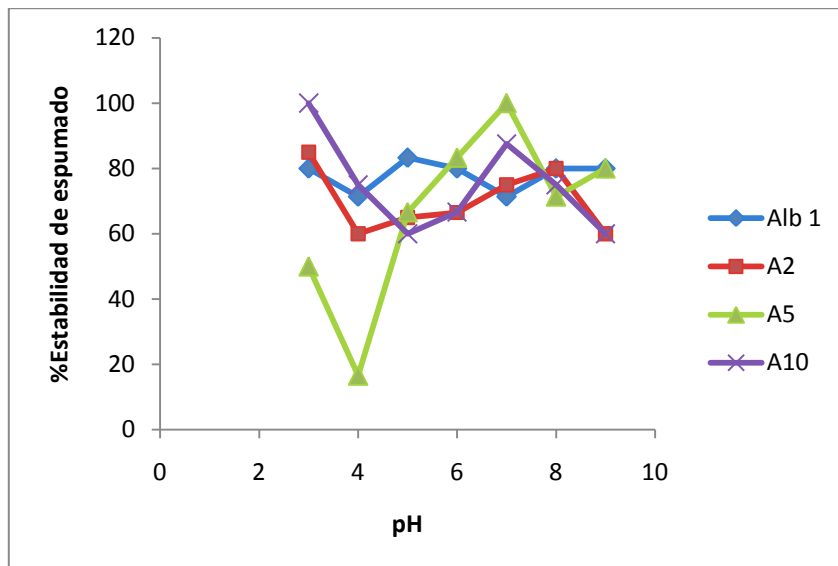


Figura 9. Estabilidad de espumado albúmina 1 (Alb 1) y sus hidrolizados a grados de hidrólisis 2, 5 y 10% (A2, A5, A10, respectivamente) a diferente pH.

8.2.3 Hidrofobicidad.

Cuando se evaluó la superficie de hidrofobicidad de la albúmina 1 y sus respectivos hidrolizados se observó que esta propiedad depende del pH ($p < 0.05$). Observando que a GH de 2 y 5% se obtuvo una mayor superficie de hidrofobicidad con respecto a la proteína sin hidrolizar. Sin embargo, para el caso de los hidrolizados obtenidos a GH de 10% el comportamiento fue distinto, es decir, una menor superficie de hidrofobicidad en comparación con la Alb 1 sin hidrolizar. De tal manera, los resultados obtenidos mostraron que no por llevar una hidrólisis más extensa existe una mayor liberación de grupos hidrofóbicos. Por lo tanto, la mayor hidrofobicidad en los hidrolizados estará relacionada con la secuencia de aminoácidos de carácter hidrófobo liberados durante la hidrólisis que con el incremento de la misma y dependerá a su vez de la proteína de origen.

Los resultados obtenidos mostraron que cuando los hidrolizados presentaron mayor superficie de hidrofobicidad se obtuvo también mayores propiedades emulsificantes. Lo cual indica que la presencia de los grupos hidrofóbicos ayuda a que se forme la interfase aceite-agua y que está se mantenga estable. Sin embargo, para el caso de la interfase aire-agua (espumado) la presencia de estos grupos parece no tener una influencia positiva o negativa.

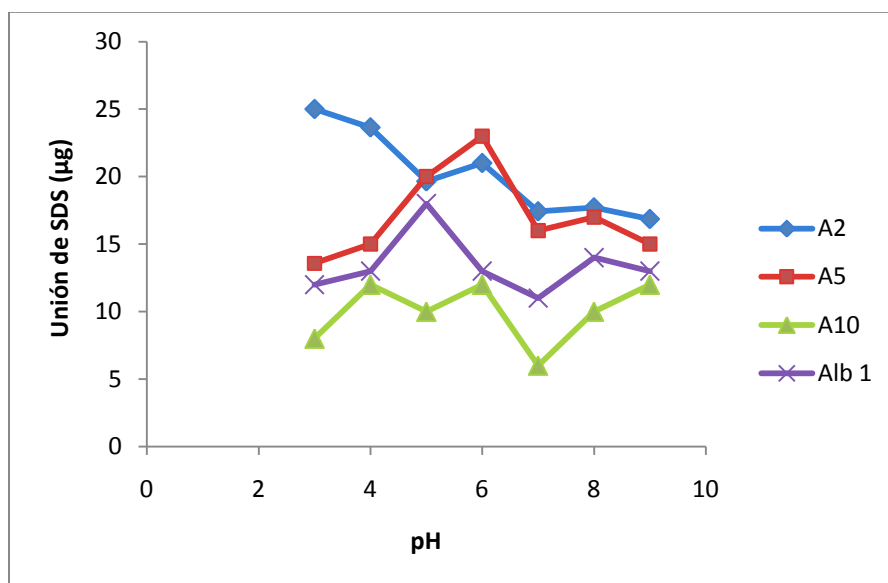


Figura 10. Efecto del pH en la unión de SDS a la albúmina 1 (Alb 1) y sus hidrolizados a grados de hidrólisis 2, 5 y 10% (A2, A5, A10, respectivamente).

8.2.4 Solubilidad

Para esta propiedad, el análisis de varianza mostró que las variables: GH, pH y su interacción tienen un efecto significativo ($p < 0.05$). Realizando la prueba de Tukey se observó que las interacciones GH 10% (A10) pH 3, 5 y 6 fueron las que presentaron mayor solubilidad ($p < 0.05$).

En la figura 11 se muestra las curvas de solubilidad en función del pH. Los hidrolizados obtenidos en los distintos GH presentaron mayor solubilidad que la albúmina 1 sin hidrolizar. Esta mayor solubilidad en los hidrolizados con respecto a la proteína original se debió a la disminución del peso molecular y a la generación de grupos hidrofílicos. Los hidrolizados al presentar una buena solubilidad pueden ser utilizados en una gran variedad de alimentos procesados.

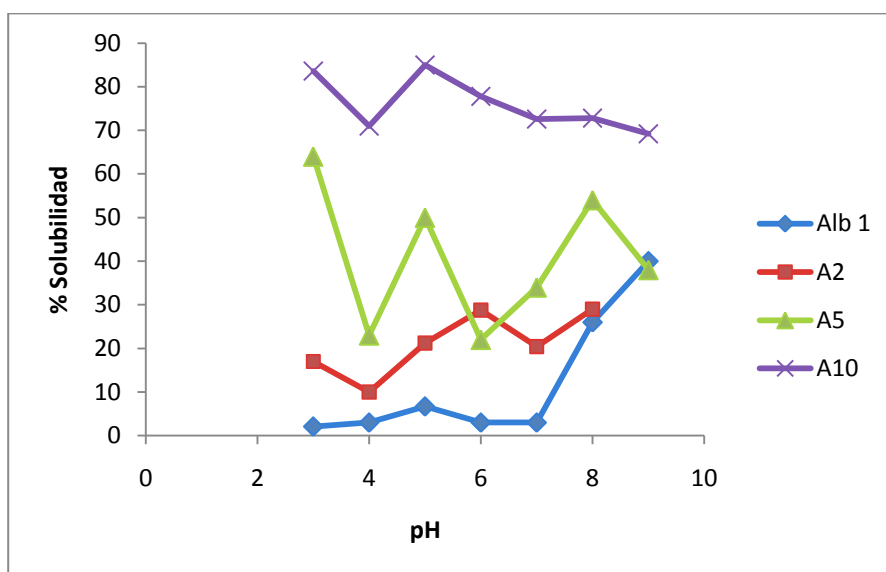


Figura 11. Solubilidad de albúmina1 (Alb 1) y sus hidrolizados a grados de hidrólisis 2, 5 y 10% (A2, A5, A10, respectivamente) a diferente pH.

8.3 Propiedades Funcionales de hidrolizados de globulina.

8.3.1 Capacidad y estabilidad de emulsión.

El análisis de varianza (ANOVA) muestra que para GH, pH y su interacción mostraron tener un efecto significativo sobre la capacidad de emulsión

($p < 0.05$), sin embargo no mostró tener un efecto significativo sobre la estabilidad ($p < 0.05$).

Realizando la prueba de Tukey para la capacidad de emulsión mostró 11 grupos significativamente diferentes ($p < 0.05$) siendo la interacción GH 10 % (G10) y pH 6 la que obtuvo la media mas alta con un valor de $43.85 \pm 1.22\%$ de capacidad de emulsión.

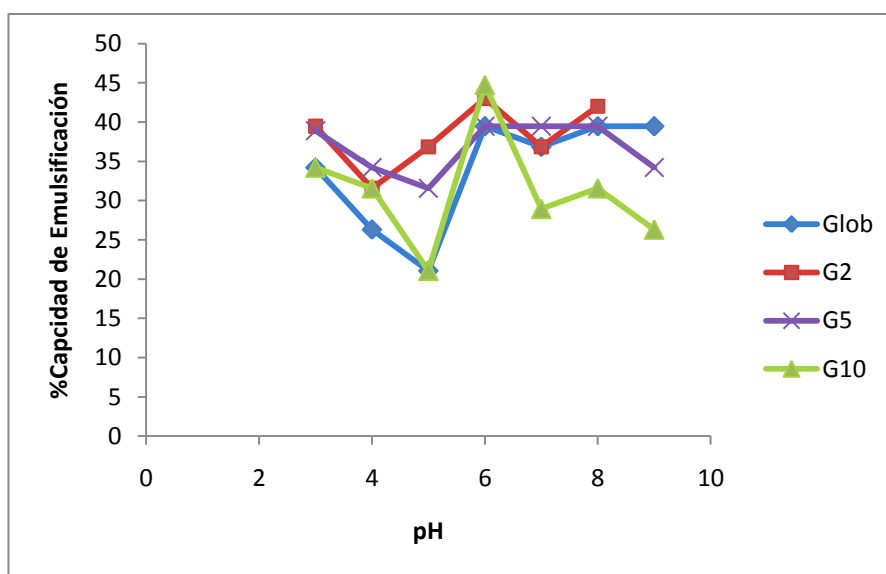


Figura 12. Capacidad de emulsificación de globulina (Glob) y sus hidrolizados a diferentes grados de hidrólisis 2, 5 y 10% (G2, G5, G10, respectivamente) a diferente pH.

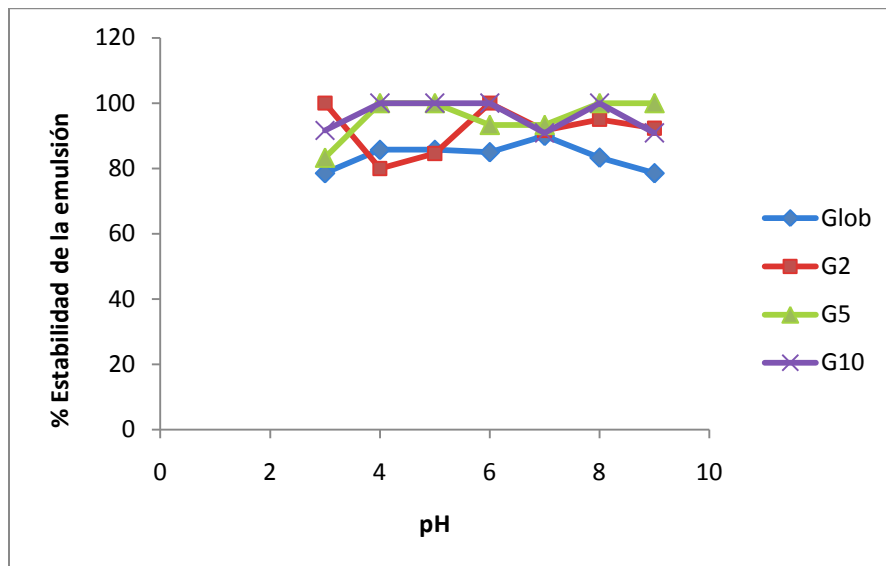


Figura 13. Estabilidad de emulsión de globulina (Glob) y sus hidrolizados a diferentes grados de hidrólisis 2, 5 y 10% (G2, G5, G10, respectivamente) a diferente pH.

8.3.2 Capacidad y estabilidad de espumado.

Para la capacidad de espumado el análisis de varianza (ANOVA) mostró que para GH, pH y su interacción mostró tener una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a la capacidad de formar espumas, por otra parte la estabilidad de espumado también presentó diferencia significativa ($p < 0.05$), para la misma interacción.

Con la prueba de Tukey para la estabilidad mostró 8 grupos que tienen diferencia significativa ($p < 0.05$), siendo la interacción GH 5% (G5) y pH 4 la de mayor estabilidad de espumado con un valor de $87.87 \pm 3.00\%$, la capacidad de espumado realizando la misma prueba presentó 14 grupos significativamente diferentes ($p < 0.05$), siendo la interacción GH 5% pH 3 la que tiene mayor capacidad de espumado con un valor de $92.5 \pm 3.53\%$.

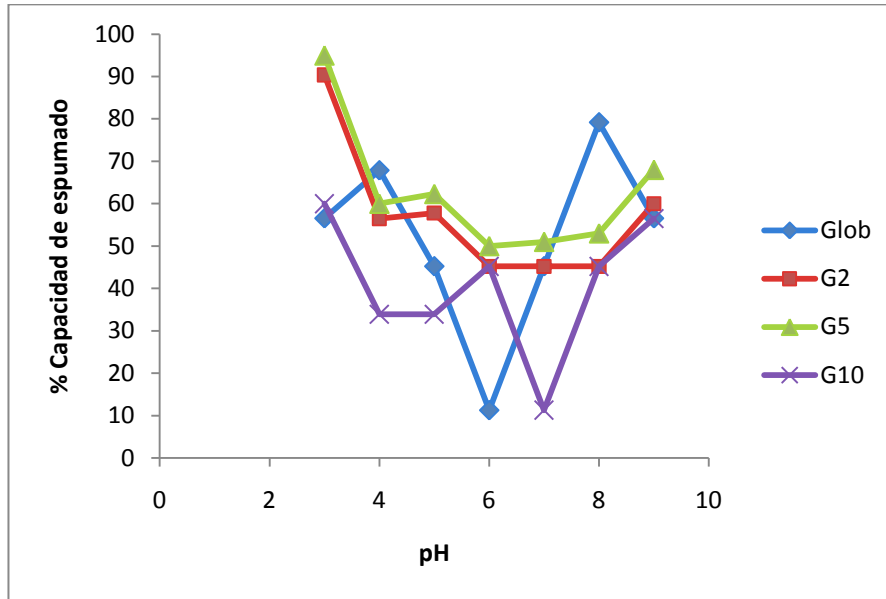


Figura 14. Capacidad de espumado de globulina (Glob) y sus hidrolizados a diferentes grados de hidrólisis 2, 5 y 10% (G2, G5, G10, respectivamente) a diferentes pH.

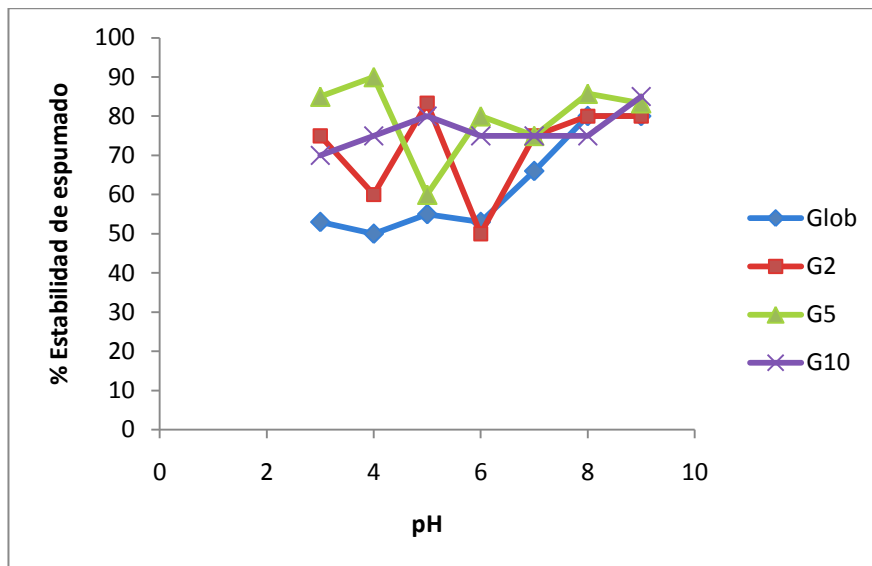


Figura 15. Estabilidad de espumado de globulina (Glob) y sus hidrolizados a diferentes grados de hidrólisis 2, 5 y 10 (G2, G5, G10, respectivamente) a diferente pH.

8.3.3 Hidrofobicidad

La hidrofobicidad de la globulina se afecta con el pH, en este caso y al igual que la albúmina 1 no se observó una relación directa al GH, es decir que conforme aumentó, no se observa un incremento en la superficie hidrófoba. Por otra parte aunque la exposición de grupos hidrófobos no se relaciona al GH directamente, se observó que los hidrolizados presentaron mayor superficie de hidrofobicidad que la globulina original.

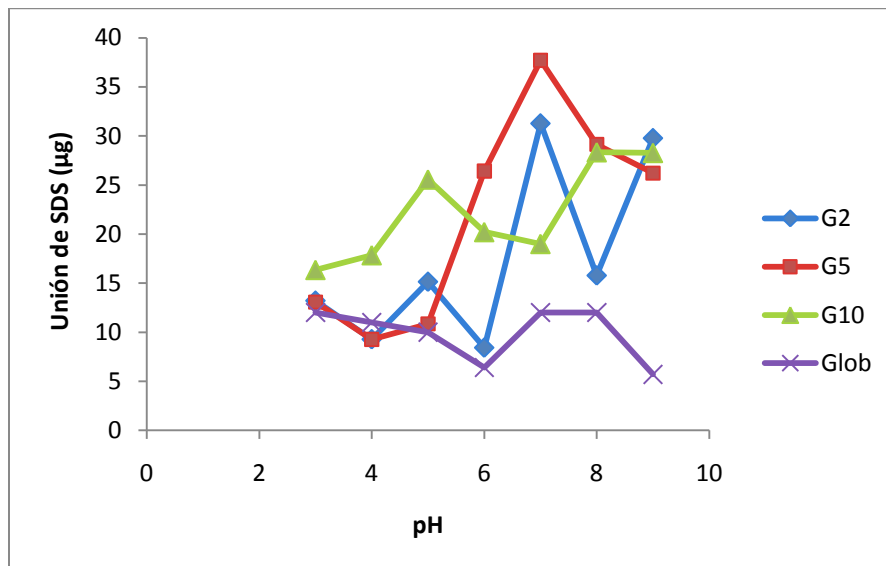


Figura 16. Efecto del pH sobre la unión de SDS a la globulina (Glob) y sus hidrolizados a diferentes grados de hidrólisis 2, 5 y 10 (G2, G5, G10, respectivamente).

8.3.4 Solubilidad.

Existe diferencia significativa ($p < 0.05$) para GH, pH y su interacción con respecto a la solubilidad con un nivel de significancia de $p < 0.05$ (ANOVA). Al realizar la prueba de Tukey presentó que hay 11 grupos significativamente diferentes ($p < 0.05$) siendo la interacción GH 2% (G2), pH 6 la de mayor solubilidad ($93.65 \pm 0.49\%$). En este caso los hidrolizados presentan una mayor solubilidad en comparación con la proteína sin hidrolizar.

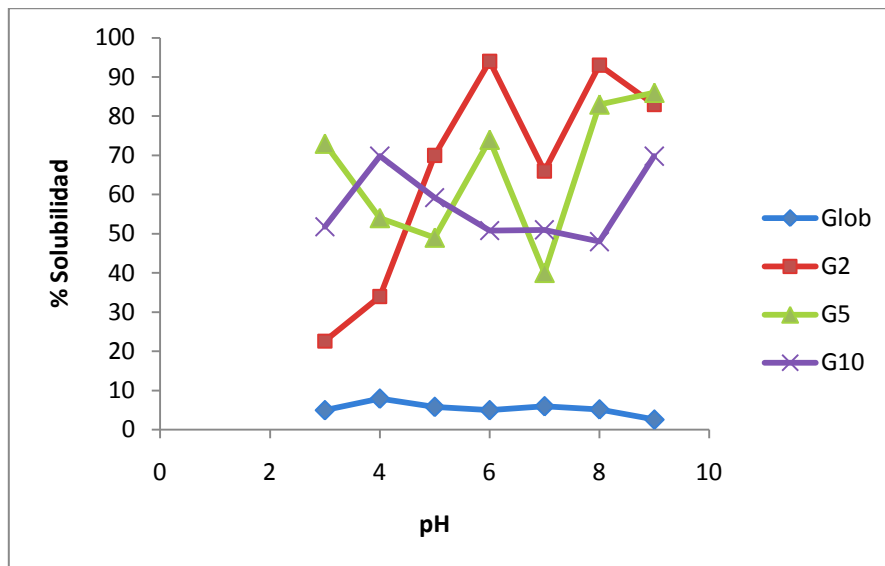


Figura 17. Solubilidad de globulina (Glob) y sus hidrolizados a diferentes grados de hidrólisis 2, 5 y 10% (G2, G5, G10, respectivamente) a diferente pH.

8.4 Caracterización de especies peptídicas de los hidrolizados.

Los pesos moleculares varían de acuerdo al grado de hidrólisis (figuras 17-22) en ambas fracciones. Se observó que conforme aumenta el grado de hidrólisis se obtuvieron cadenas peptídicas de menor peso molecular, como era lo esperado.

Estos pesos moleculares entre otros factores determinan propiedades funcionales como lo es para la capacidad de espuma, en donde se observó que para el caso de albúmina 1 a GH de 10% y para globulina a GH de 5% se obtuvo la mayor capacidad de espumado (figuras 19 y 21, respectivamente).

De tal manera, que péptidos de bajo peso molecular favorecen la formación y estabilización de espumas.

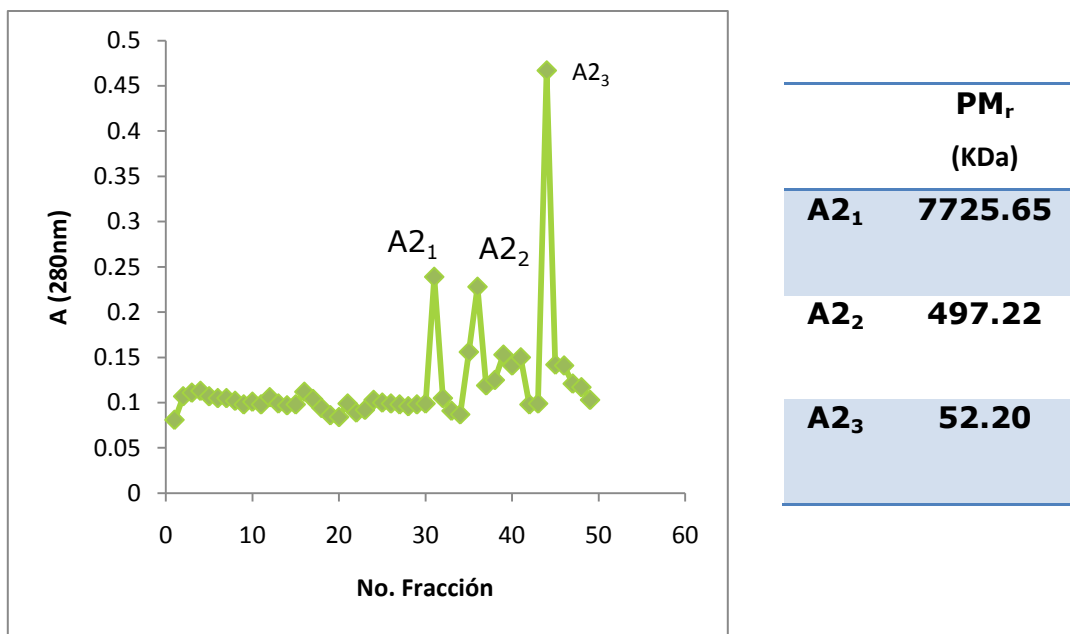


Figura 18. Cromatograma de filtración en gel (Sephadex G-200) de hidrolizados de albumina 1 con GH 2% (A2).

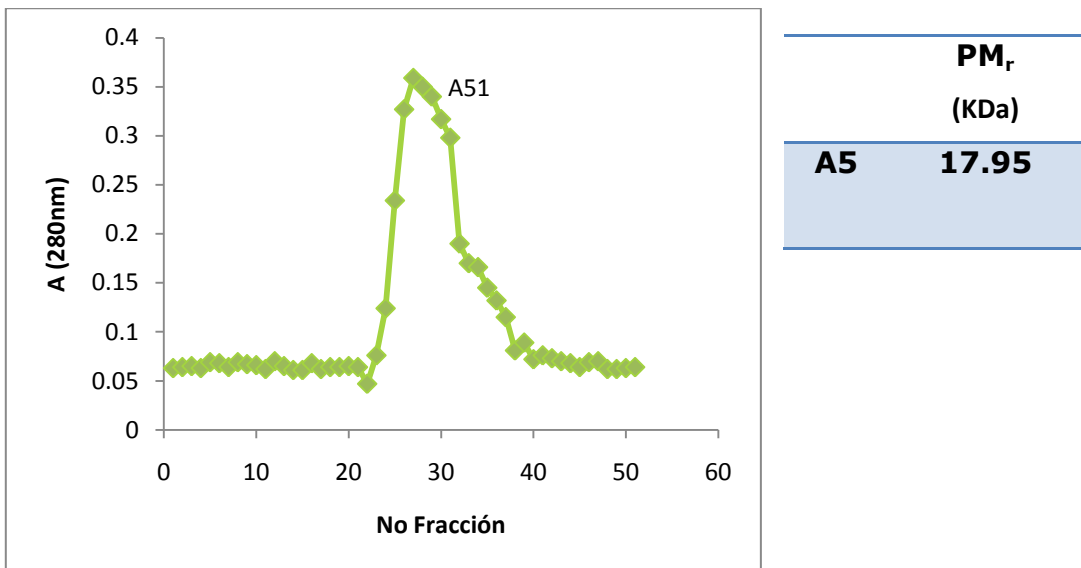


Figura 19. Cromatograma de filtración en gel (Sephadex G-200) de hidrolizados de albúmina 1 con GH 5% (A5).

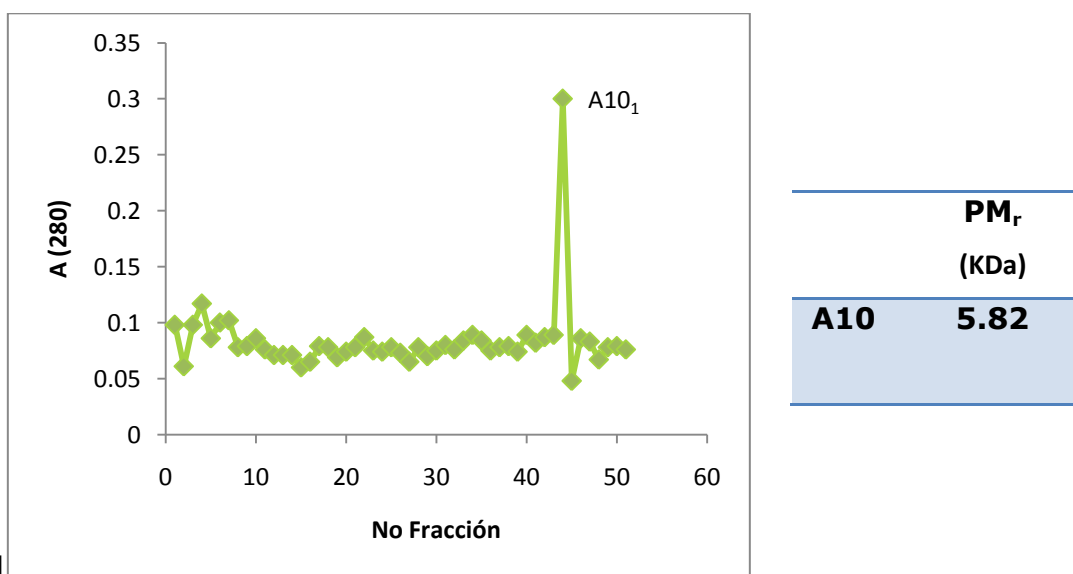


Figura 20. Cromatograma de filtración en gel (Sephadex G-200) de hidrolizados de albúmina 1 con GH 10% (A10).

En el caso de la emulsión se ha reportado que péptidos de 500Da son necesarios para estabilizar las mismas, pero no sólo dependen del peso si no de otras propiedades como la hidrofobicidad, la cual juega un papel importante en la estabilización de la emulsión. Las cadenas cortas de péptidos en este caso presentaron mayor capacidad de emulsión.

Por otra parte en el caso de la solubilidad, los hidrolizados de albúmina 1 presentaron un comportamiento distinto a los hidrolizados de globulina. Para el caso de los hidrolizados de albúmina 1, el GH 10% en el cual se obtuvo un peso molecular de 5.2 kDa (figura 19) es el que presentó la mayor solubilidad y sin embargo, fue el que presentó menor hidrofobicidad lo que era de esperarse, aunque en el caso de los hidrolizados de globulina el GH 2% (figura 20) es el que presentó la mayor solubilidad correspondientes a pesos moleculares entre 90-276 kDa.

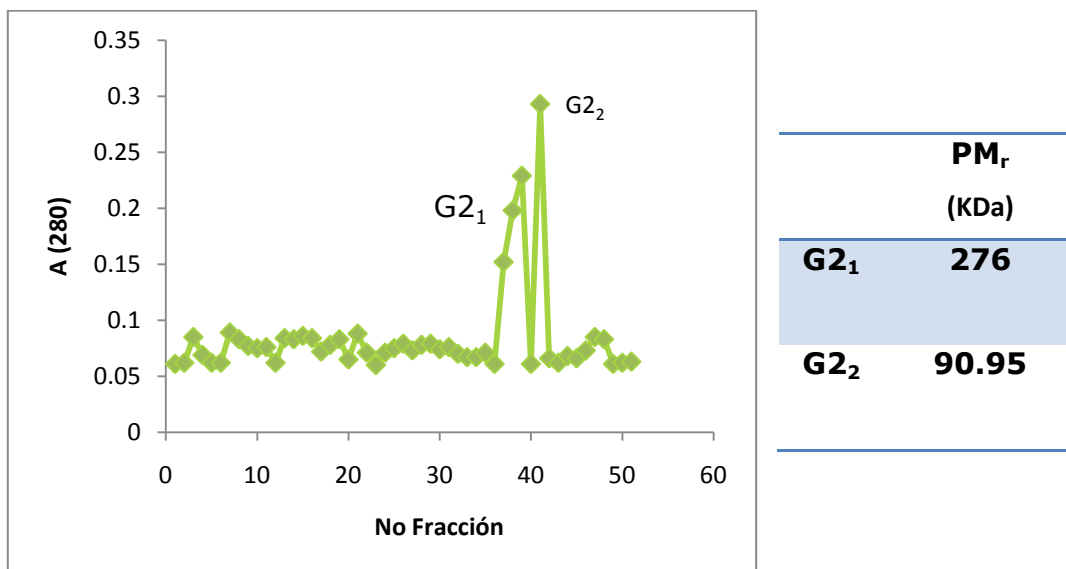


Figura 21. Cromatograma de filtración en gel (Sephadex G-200) de hidrolizados de globulina con GH 2% (G2).

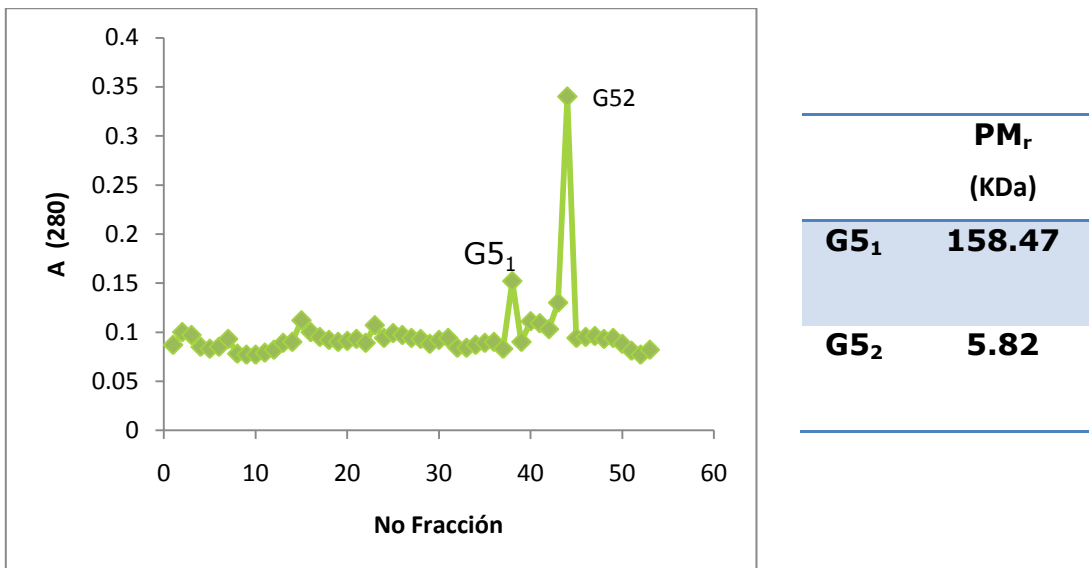


Figura 22. Cromatograma de filtración en gel (Sephadex G -200) de hidrolizados de globulina con GH 5% (G5).

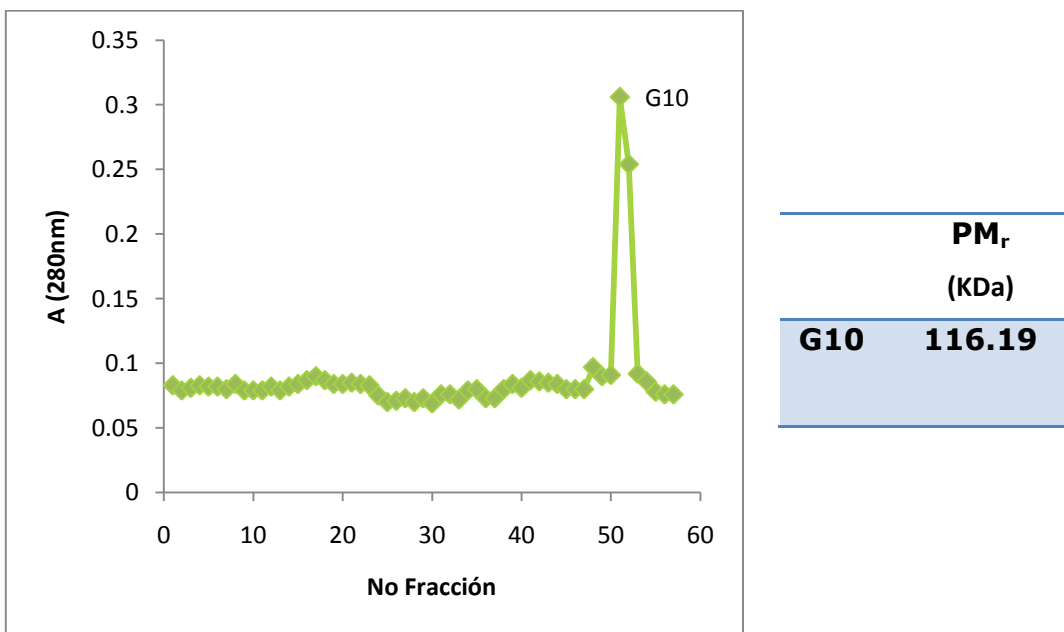


Figura 23. Cromatograma de filtración en gel (Sephadex G-200) de hidrolizados de globulina con GH 10% (G10).

De tal forma, como se ha visto con proteínas de otras fuentes alimentarias, algunos de los hidrolizados potencian las propiedades funcionales a $\text{GH} \leq 10\%$ (hidrólisis limitada), que fue el valor máximo de GH utilizado en el presente trabajo.

8.5 Superficies de respuesta (optimización).

De acuerdo a los resultados obtenidos para las propiedades de espumado y emulsificación se llevo a cabo una optimización (en los casos posibles) con el fin de encontrar las condiciones de hidrólisis en las cuales se obtienen los valores más altos de las propiedades funcionales evaluadas para los rangos de grado de hidrólisis y pH utilizados.

8.5.1 Propiedades funcionales de hidrolizados de albúmina 1.

Para el caso de la capacidad de emulsificación la superficie de respuesta se logró optimizar, ya que presentó un comportamiento en el cual se logró obtener un máximo (figura 24). Con la combinación: $\text{GH} = 7$ y $\text{pH} = 6.5$ se obtuvo la mayor capacidad emulsificante (37%).

La superficie de respuesta optimizada para la capacidad de emulsificación (y) en función del grado de hidrólisis (x_1) y pH (x_2), se ajustó a un modelo de 1^{er} orden:

$$y = 18.62 + 0.117 x_1 x_2 + 4.24 x_2 + 1.94 x_1$$

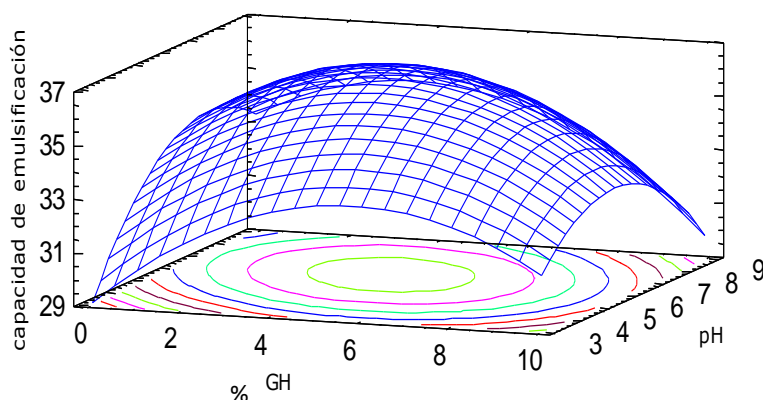


Figura 24. Superficie de respuesta de la capacidad de emulsificación de hidrolizados de albúmina 1.

Para el caso de la superficie de respuesta para la estabilidad de emulsificación (figura 25) se observó que existe un valor máximo correspondiente a la mayor estabilidad de emulsión (97.32%), la cual se obtuvo con la combinación de los niveles GH = 2 y pH = 9. Ya que en este caso la zona de estudio solo permitió conocer los niveles ideales para la estabilización de emulsiones y no fue posible obtener una optimización debido a que el incremento de la estabilidad se encuentra hacia GH <2%, lo que nos llevaría a la proteína nativa.

Por lo tanto, la superficie de respuesta para la estabilidad de emulsión (y) en función del grado de hidrólisis (x_1) y pH (x_2), también se ajustó a un modelo de 1^{er} orden:

$$y = -188.5 - 0.312 x_1 x_2 + 66.43 x_2 + 49.83 x_1$$

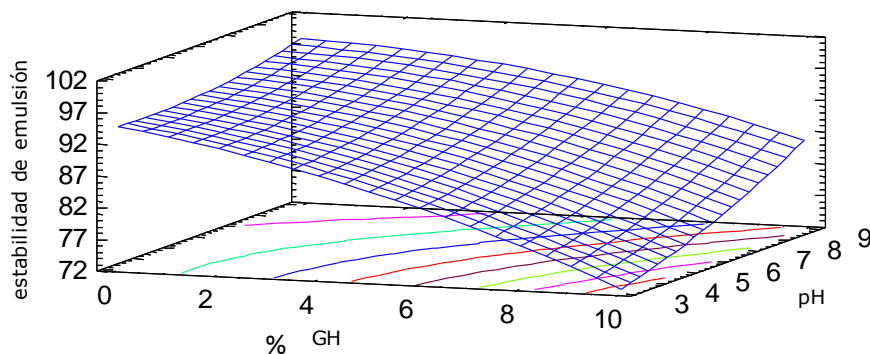


Figura 25. Superficie de respuesta de la estabilidad de emulsión de hidrolizados de albúmina 1.

En la superficie de respuesta se observó (figura 26) que hay un valor máximo que proporciona la mayor capacidad de espumado (85.15%) hacia GH bajo y pH ácido con la combinación de los niveles GH = 2 y pH = 9. En este caso como el anterior, sólo se logró obtener las mejores condiciones más no así la optimización, en este caso en particular, los hidrolizados con GH mayor a 10% se piensa que ayudarían a establecer la optimización, ya que como se observa en la figura 26 sería interesante conocer el comportamiento de la superficie a GH extensivos es decir mayores a 10%.

La superficie de respuesta para la capacidad de espumado (y) en función del grado de hidrólisis (x_1) y pH (x_2), se ajustó a un modelo de 2º orden:

$$Y = -25.61 - 1.20 x_1 x_2 + 24.71 x_2 + 0.80 x_1 - 1.14 x_2^2 + 0.55 x_1^2$$

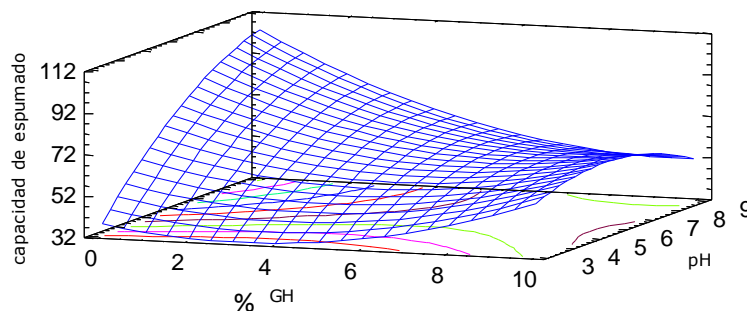


Figura 26. Superficie de respuesta de la capacidad de espumado de hidrolizados de albúmina 1.

En la superficie de respuesta optimizada se pudo observar (figura 27) un máximo que proporciona la mayor estabilidad de espumado (77.84%) formado con la combinación de los niveles GH = 4.5 y pH = 7. Para este caso la optimización se logró llevar a cabo con los niveles de estudio.

La superficie de respuesta para la estabilidad de espumado (y) en función del grado de hidrólisis (x_1) y pH (x_2), se ajustó un modelo de 2º orden:

$$Y = -135.50 + 3.21 x_1 x_2 + 94.25 x_2 - 31.80 x_1 - 8.57 x_2^2 + 1.93 x_1^2$$

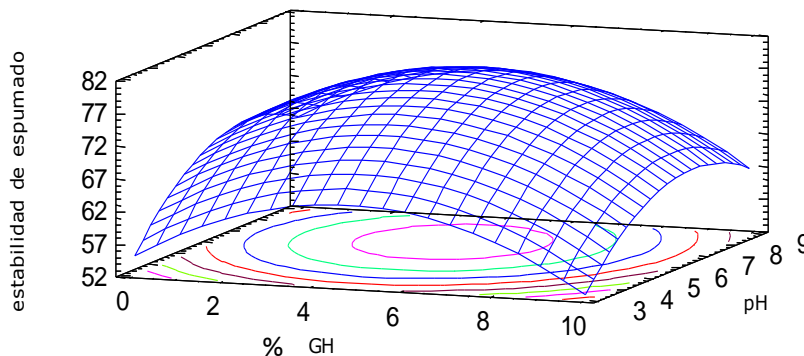


Figura 27. Superficie de respuesta de la estabilidad de espumado de hidrolizados de albúmina 1

8.5.2 Propiedades funcionales de hidrolizados de globulina.

En la superficie de respuesta optimizada se pudo ver (figura 28) que hay un valor máximo que proporciona la mayor capacidad de emulsificación (38.48%) se encontró hacia GH bajo y pH cercano al neutro con la combinación de los niveles GH = 2 y pH = 7. Al igual que en la superficie anterior se pudo llegar a la optimización con las condiciones de GH y pH trabajados.

La superficie de respuesta para la capacidad de emulsificación (y) en función del grado de hidrólisis (x_1) y pH (x_2), se presenta ajustó a un modelo de 2º orden:

$$Y = 24.575 + 0.129 x_1 x_2 - 3.96 x_2 + 1.10 x_1 + 0.272 x_2^2 - 0.094 x_1^2$$

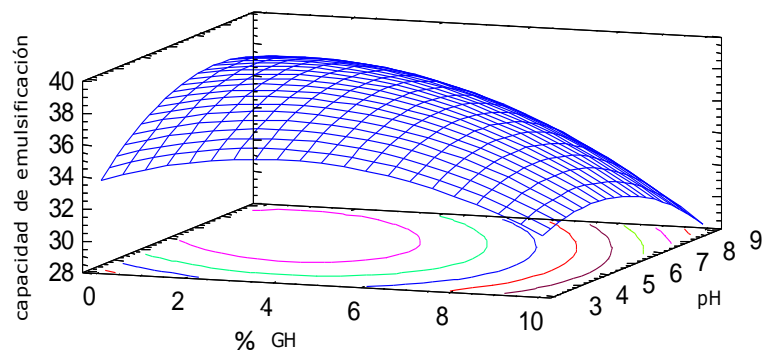


Figura 28. Superficie de respuesta de la capacidad de emulsificación de hidrolizados de globulina.

En la superficie de respuesta optimizada se observó (figura 29) un máximo que proporciona la mayor estabilidad de emulsión (97.54%) hacia GH medio y pH cercano al neutro, siendo la combinación de los niveles GH = 7 y pH = 6.5. Se logró obtener la optimización con los factores y niveles de estudio evaluados.

La superficie de respuesta para la estabilidad de emulsión (y) en función del grado de hidrólisis (x_1) y pH (x_2), se ajustó a un modelo de 2º orden:

$$Y = 70.36 - 0.146 x_1 x_2 + 5.92 x_2 + 2.27 x_1 - 0.37 x_2^2 - 0.096 x_1^2$$

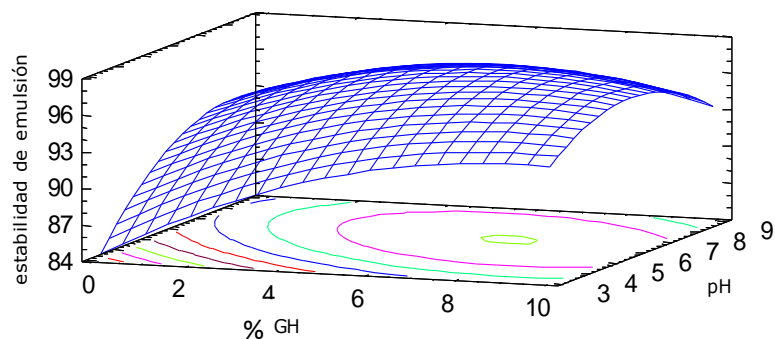


Figura 29. Superficie de respuesta de la estabilidad de emulsión de hidrolizados de globulina.

En la superficie de respuesta se observó (figura 30) que existe un máximo que proporciona la mayor capacidad de espumado (86.03%) hacia GH bajo y pH ácido por lo que la combinación de los niveles son GH = 3 y pH = 3. Para este caso la optimización no se logró, ya que se observó el comportamiento de los hidrolizados para los niveles de pH, estos presentaron los valores más altos en las orillas es decir en pH 3 y pH 9, y lo que sucedió para GH fue un decremento con el aumento del mismo.

La superficie de respuesta para la capacidad de espumado (y) en función del grado de hidrólisis (x_1) y pH (x_2), se ajustó a un modelo de 2º orden:

$$Y = 166.58 + 1.034 x_1 x_2 - 36.759 x_2 + 2.438 x_1 + 2.457 x_2^2 - 0.939 x_1^2$$

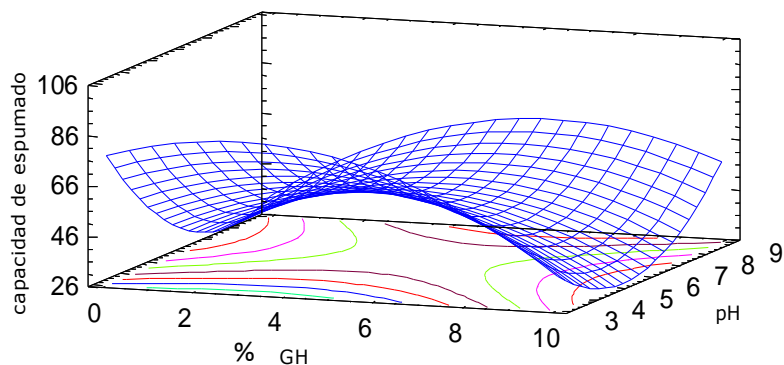


Figura 30. Superficie de respuesta de la capacidad de espumado de hidrolizados de globulina.

En la superficie de respuesta se observó (figura 31) que existe un máximo hacia pH básico y GH alto en la estabilización de espumado (87.14%), por lo que la combinación de los niveles que proporciona la mayor estabilidad de espumado son GH = 10 y pH = 9. En este caso y al igual que en la superficie de la figura 26 sería interesante conocer los resultados a un GH mayor al 10% para saber si la optimización puede llegar a lograrse.

La superficie de respuesta para la estabilidad de espuma (y) en función del grado de hidrólisis (x_1) y pH (x_2), se ajustó a un modelo de 1^{er} orden:

$$Y = 78.91 + 0.042 x_1 x_2 - 5.90 x_2 + 4.13 x_1$$

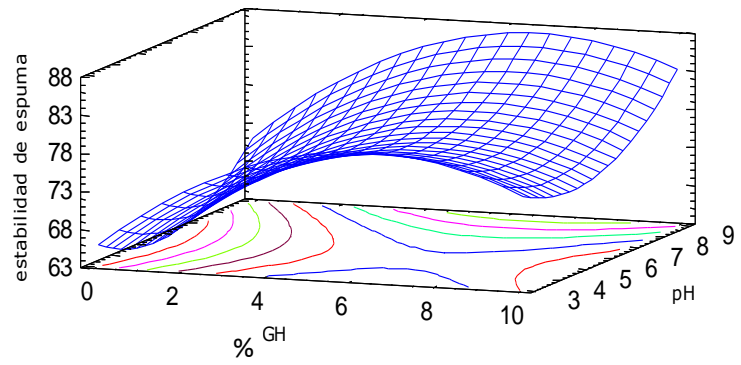


Figura 31. Superficie de respuesta de la estabilidad de espumado de hidrolizados de globulina.

8.6 Actividad Antioxidante.

Se evaluó la actividad antioxidante con base en los resultados obtenidos en la optimización de los hidrolizados de ambas fracciones (albúmina 1 y globulina) que presentaron la mayor capacidad y estabilidad para espumas y emulsiones, respectivamente.

8.6.1 Espumas y emulsiones con actividad antioxidante de hidrolizados de albúmina 1.

Se muestra en la tabla 9 la reducción del radical ABTS⁺ y la reducción de radical DPPH* de los distintos hidrolizados de albúmina 1 en equivalentes de distintos antioxidantes: GSH, trolox y ácido galico. Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se obtuvo que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los distintos GH, y mediante la prueba de Tukey se obtuvo que el hidrolizado que presenta la mayor actividad antioxidante es el GH = 7%, que corresponde a un tiempo de 3.3 h. y a la mayor capacidad de emulsificación para ambos métodos.

Tabla 9. Actividad antioxidante de espumas y emulsiones de hidrolizados de albúmina 1 evaluada por el método de decoloración de ABTS⁺ y DDPH*.

Propiedad Funcional	Método decoloración de radical ABTS ⁺				Método DPPH*			
	GSH mg eq/mL	Trolox µg eq/mL	Ac. Gálico mg eq/mL	%Inhibición	GSH mg eq/mL	Trolox µg eq/mL	Ac. Gálico mg eq/mL	%Inhibición
E75.5	855.21±4.98	839.68±8.40	103.81±1.22	61.85	929.69±2.92	170.35±0.35	55.00±0.17	63.21
E29	324.52±3.94	321.47±5.85	79.59±0.86	34.24	480.36±1.85	132.69±0.70	44.28±0.20	
F29	312.18±6.25	397.66±3.87	71.85±0.82	34.18	459.40±6.05	139.12±0.60	43.29±0.75	39.95
F4.57	728.99±5.96	716.43±4.85	98.05±0.44	58.14	838.30±9.26	148.27±0.35	47.28±0.43	60.48

E75.5= Emulsión obtenida a GH=7 y pH 5.5

E29= Emulsión obtenida a GH=2 y pH 9

F29= Espuma obtenida a GH=2 y pH 9

F4.57= Espuma obtenida a GH=4.5 y pH 7

8.6.2 Espumas y emulsiones de hidrolizados de globulina.

Se muestran en la tabla 10 la reducción del radical ABTS⁺ y la reducción del radical DPPH* de los hidrolizados de globulina en equivalentes de distintos antioxidantes: GHS, trolox y ácido galico. Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se obtuvo que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los distintos GH, y mediante la prueba de Tukey se obtuvo que el hidrolizado que presenta la mayor actividad antioxidante es el GH = 10%, que corresponde a un tiempo de 12 h. y a la mayor estabilidad de espumado para ambos métodos.

Para las espumas y emulsiones formadas a partir de hidrolizados de albúmina se observó que conforme aumenta el grado de hidrólisis, aumenta la actividad antioxidante, ya que conforme aumenta el grado de hidrólisis se van liberando péptidos de bajo peso molecular, lo que concuerda con otros trabajos reportados en la literatura para fuentes proteicas extraídas de la soya Hua y cols. (1996), huevo Chen y cols. (1996) y alfalfa Zhengjun y cols. (2009), donde los péptidos que presentaron actividad antioxidante son de bajo peso molecular.

De igual forma para las espumas y emulsiones obtenidas de hidrolizados de globulina la actividad antioxidante se incrementó conforme aumentó el grado de hidrólisis. Por lo que se observó un comportamiento similar para la albúmina 1 y globulina sin importar el método empleado.

Tabla 10. Valores de actividad antioxidante de espumas y emulsiones de hidrolizados de albúmina 1 obtenidos por el método de decoloración de ABTS* y método DPPH*.

Propiedad Funcional	Método decoloración de radical ABTS*				Método DPPH*			
	GSH mg eq/mL	Trolox µg eq/mL	Ac. Gálico mg eq/mL	%Inhibición	GSH mg eq/mL	Trolox µg eq/mL	Ac. Gálico mg eq/mL	%Inhibición
E27	238,46±4,96	237,44±4,85	75,66±0,22	32,83	396,47±2,67	356,19±0,35	39,55±0,15	46,97
E76.5	984,30±4,96	965,73±4,85	109,70±0,23	64,14	448,63±6,05	360,05±5,04	40,66±0,17	47,32
F33	404,84±8,60	399,90±8,40	85,20±0,39	46,75	293,47±4,51	234,16±0,93	38,97±0,26	34,88
F109	1391,64±9,93	1363±9,7	128,29±0,45	70,71	1089,19±8,67	992,90±9,35	60,74±0,74	68,73

E27= Emulsión obtenida a GH=2 y pH 7

E76.5= Emulsión obtenida a GH=7 y pH 6.5

F3.3= Espuma obtenida a GH=3 y pH 3

F109= Espuma obtenida a GH=10 y pH 9

Un estudio de Huang y cols. (2005) se menciona que tanto para el método ABTS⁺ como para el método DPPH* se lleva a cabo un mecanismo de TE (transferencia de electrón), lo que permite suponer que en los péptidos obtenidos presentes en las espumas y emulsiones predomina este mecanismo, lo que concuerda con estudios de Ortiz, (2010) en los que al realizar la metodología de poder reductor en la cual predomina el mecanismo HAT (transferencia de átomo de hidrogeno) se observó que este mecanismo no es predominante para hidrolizados de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto. Así mismo esta capacidad de reducir radicales esta asociada a los aminoácidos histidina, prolina y tirosina entre otros. (Uchida y cols., 1992).

En el caso particular de los hidrolizados de globulina es importante destacar su actividad, ya que con esta se encuentra un estudio reportado por Valeria y cols. (2009) en el que al igual que en este estudio la globulina presentó los valores mas altos de actividad antioxidante siendo en este trabajo de casi el 70% de inhibición de radical DPPH lo que la compara con otras fuentes de péptidos obtenidas a partir de alfalfa Zhengjun y cols. (2009) con valor de 70% de inhibición de radical DPPH y la pone por encima de otras como el atún Jae y cols. (2007) con un valor de 40% de inhibición de radical DPPH.

De tal forma que para las espumas y emulsiones obtenías a partir de hidrolizados de albúmina 1 y globulina provenientes del grano de amaranto los valores de actividad antioxidante son comparables con otras fuentes de péptidos, lo que los coloca como una buena fuente de péptidos antioxidantes para su uso en algún tipo de alimento funcional, en el cual además de aportar mejoras a capacidad y estabilidad de espumas y emulsiones posee un valor benéfico para la salud.

IX. CONCLUSIONES

Las condiciones de hidrólisis utilizando pepsina de la albúmina 1 y de la globulina del grano de amaranto para alcanzar el 2, 5 y 10 % de grado de hidrólisis fueron: E/S=50.4 U/g de proteína; T= 37°C; pH= 2.0.

La hidrólisis con pepsina del 2 al 10% GH de la albúmina 1 y globulina resulta en una mejora de las propiedades de emulsificación, espumado y solubilidad, en comparación a las propiedades observadas sobre las mismas proteínas sin hidrolizar.

La modificación de las propiedades funcionales de los hidrolizados de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto, dependen de diferentes factores fisicoquímicos como son: grado de hidrólisis, pH, presencia de grupos hidrofóbicos y de la distribución del peso molecular.

Las espumas y emulsiones formadas a partir de hidrolizados de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto presentan actividad antioxidante.

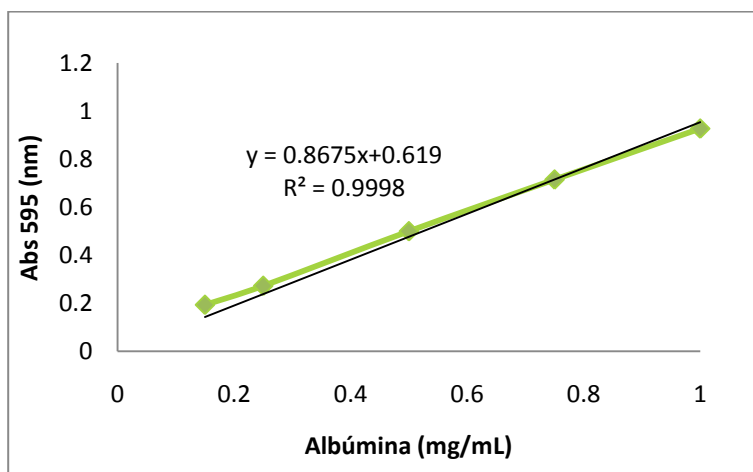
Los GH 10 y 7% que corresponden a 12 y 3.3h respectivamente, formaron las espumas y emulsiones con los valores más altos de actividad antioxidante, representando esto que conforme aumenta el grado de hidrólisis hay un incremento en la actividad antioxidante.

ANEXOS

Anexo 1.

Análisis de Regresión lineal para calcular la concentración de albúmina y globulina obtenidas del grano de amaranto *Amaranthus Hypochondriacus L.*

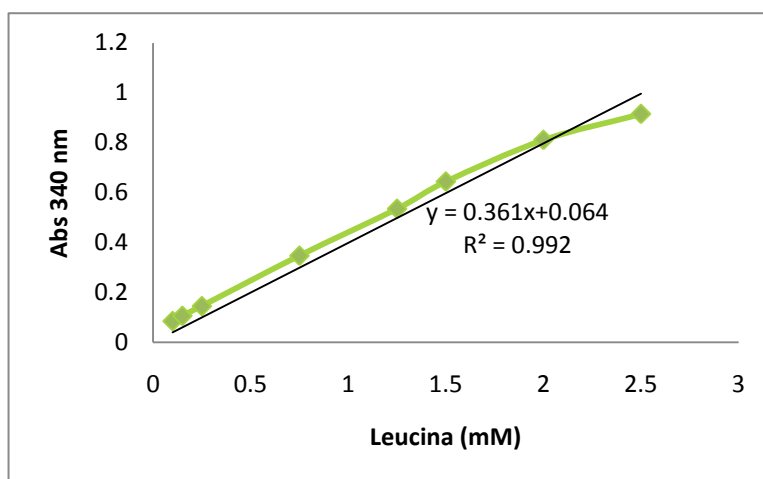
Albúmina bovina (mg/mL)	Abs 595 nm
0.15	0.194±0.03
0.25	0.273±0.00
0.5	0.500±0.01
0.75	0.715±0.02
1	0.927±0.01



Anexo 2.

Análisis Regresión lineal para calcular la concentración de hidrolizados de albumina y globulina del grano de amranto *Amaranthus Hypochondriacus L.*

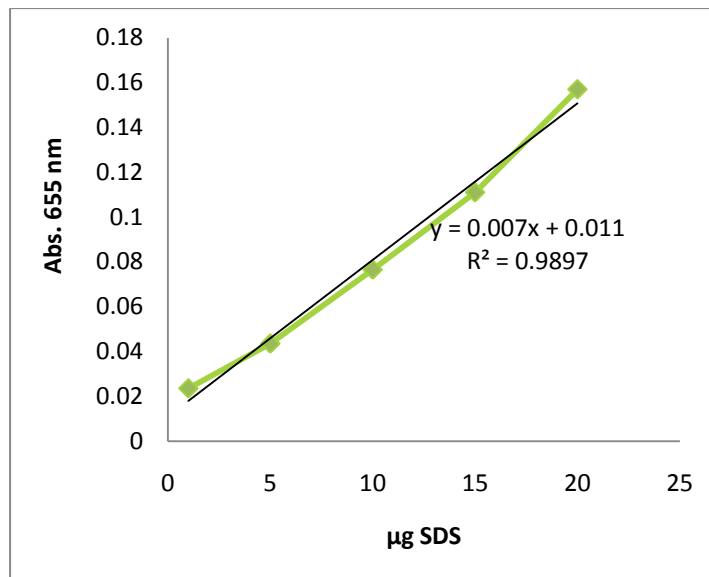
Leucina	Abs. 340 nm
0.1	0.085±0.003
0.15	0.106±0.003
0.25	0.145±0.006
0.75	0.347±0.004
1.25	0.535±0.004
1.5	0.644±.0.005
2.5	0.915±0.006



Anexo 3.

Curva patrón de concentración de SDS que se unió a albúmina bovina sérica, para calcular la superficie de hidrofobicidad.

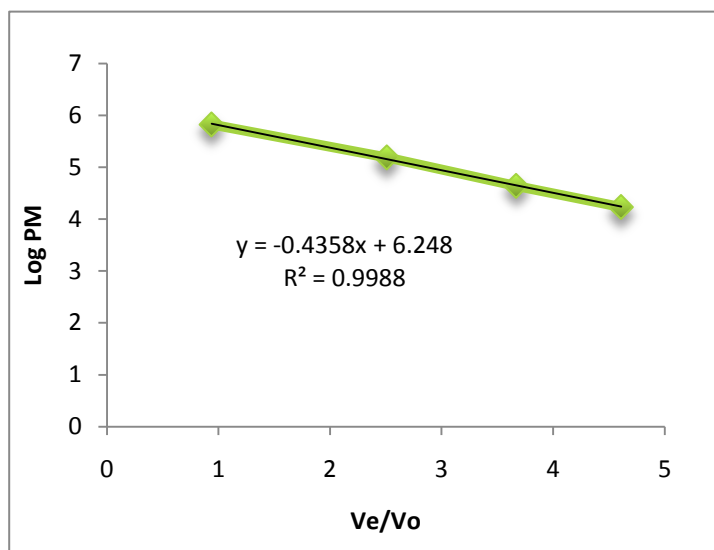
[μg SDS]	Abs 655 nm
1	0.0235 \pm 0.001
5	0.0435 \pm 0.001
10	0.0765 \pm 0.005
15	0.111 \pm 0.006
20	0.157 \pm 0.006



Anexo 4.

Curva patrón de marcadores utilizados para la filtración en gel Sephadex G-200.

Proteína	Ve/Vo	Log PM
Tiroglobulina	0.94	5.82
γ-globulina	2.51	5.19
Ovoalbumina	3.67	4.64
Mioglobulina	4.61	4.23

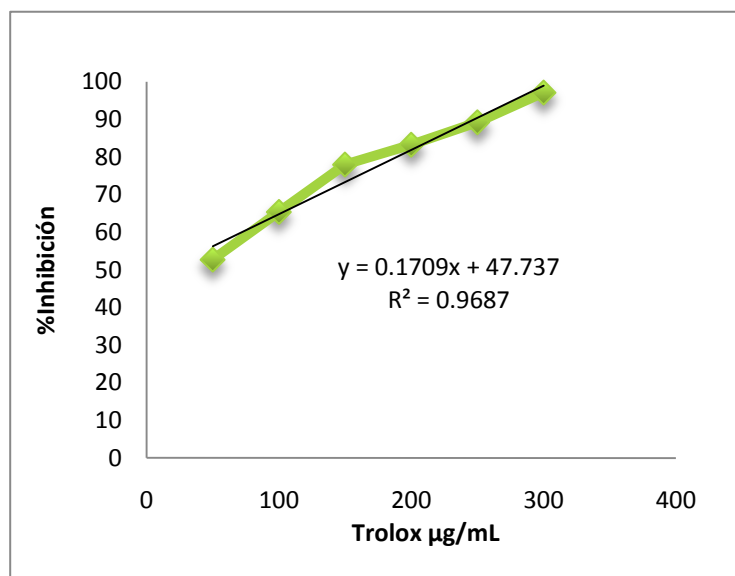


Anexo 5.

Análisis de Regresión lineal para determinar la capacidad antioxidante por el método de reducción de radical catiónico $ABTS^+$ de los hidrolizados de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto *Amaranthus Hypochondriacus L.* en antioxidan

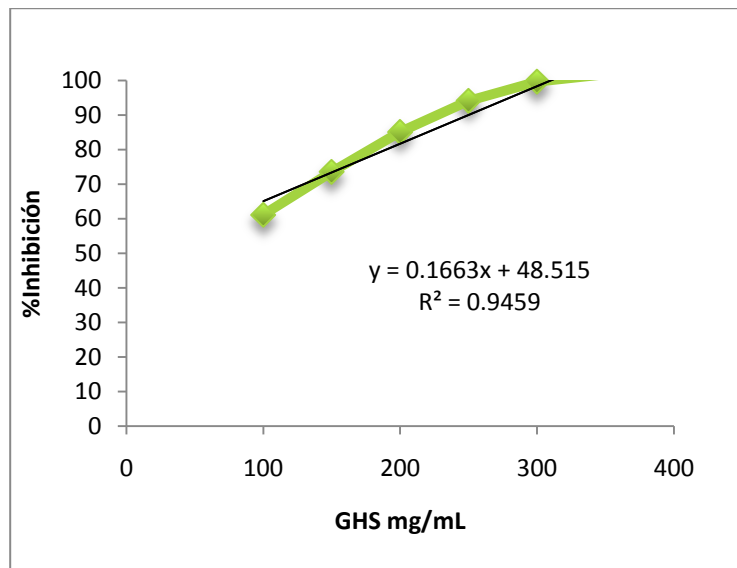
tes de referencia: eqTROLOX/mL, eqAG/mL y eqGSH/mL.

Trolox ($\mu\text{g/mL}$)	%Inhibición
300	97.4 \pm 1.25
250	89.28 \pm 1.34
200	83.28 \pm 1.49
150	78.00 \pm 1.58
100	65.42 \pm 1.78
50	52.71 \pm 1.52

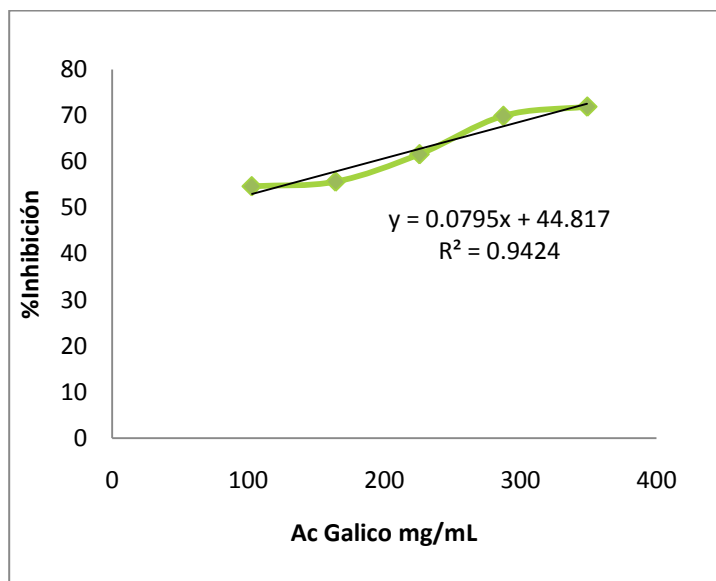


ANEXOS

GHS (mg/mL)	%Inhibición
350	101.85±1.56
300	99.71±1.19
250	94.14±1.50
200	85.14±1.90
150	73.57±2.10
100	61.14±1.20



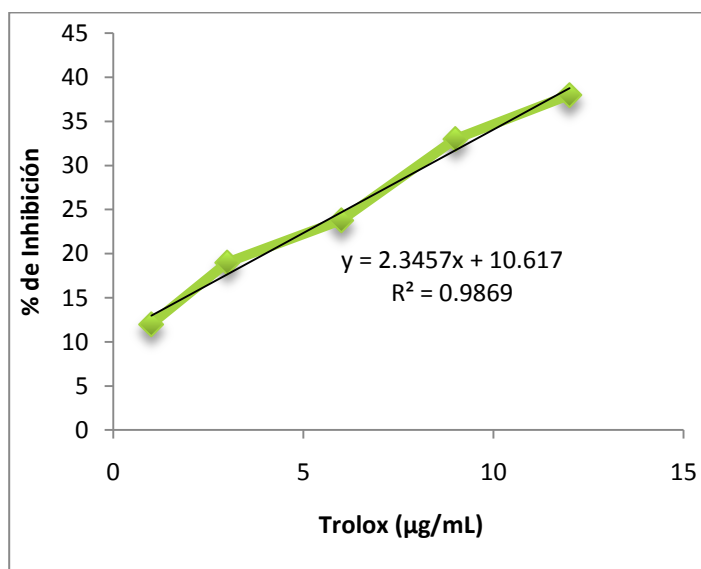
Ac Galico [mg/mL]	Inhibición (%)
102.65	54.64±0.46
164.23	55.65±2.04
225.82	61.61±1.91
287.41	69.95±2.04
348.99	71.96±0.63



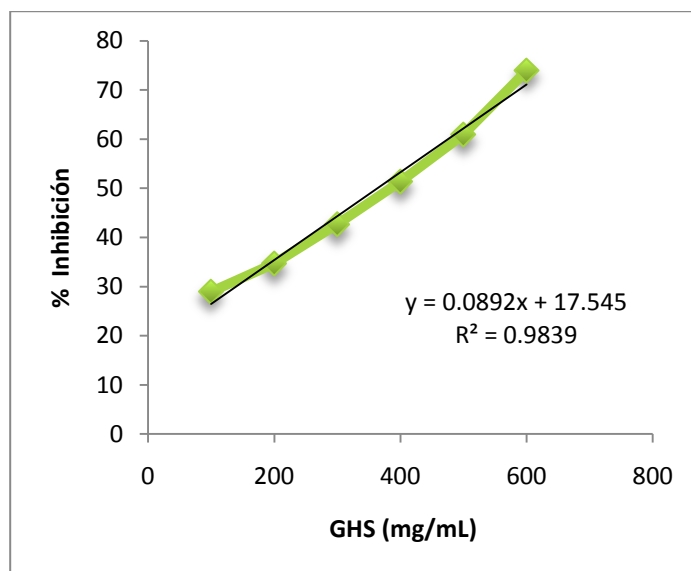
Anexo 6.

Análisis de Regresión lineal para determinar la capacidad antioxidante por el método de reducción de radical DPPH* de los hidrolizados de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto *Amaranthus Hypochondriacus L.* en antioxidantes de referencia: eqGSH/mL. eqTROLOX/mL, eqAG/mL.

Trolox ($\mu\text{g/mL}$)	%Inhibición
1	12.00 \pm 0.11
3	19.00 \pm 0.19
6	23.80 \pm 0.17
9	33.00 \pm 0.42
12	38.00 \pm 0.35



GHS (mg/mL)	%Inhibición
600	73.97±0.83
500	60.95±0.75
400	51.36±0.69
300	42.69±0.78
200	34.70±0.35
100	28.29±.25



X. BIBLIOGRAFÍA

Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27: 1256-1262.

Aluko, R., Yada Y. (1997) Some Physicochemical and Functional Properties of Cowpea (*Vigna Unguiculata*) Isoelectric Protein Isolate as a Function of PH and Salt Concentration *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 48(1): 31-39.

Arnao, M. B.; Cano, A.; Hernández, J. R.; García, F. C. y Acosta, M. (1996). Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: A new approach for determining total antioxidant status of foods. *Analytical Biochemistry*. 236: 225-261.

Benítez , R, Ibartz, A y Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *ABCLD*, 42(2): 227-236.

Böhm, V. y Schlesier, K. (2004). Methods to evaluate the antioxidant activity. *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops*. 3: 55-71.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Bressani, R. y García, L. A. V. (1990). Proteins fraction in amaranth grain and their chemical characterization. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 38: 1205-1215.

Childs, R. E. y Bardsley, W. G. (1975). The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochemical Journal*. 145: 93-103.

Fennema O. (1993). *Química de los alimentos*, España, 2ª edición, Editorial Acriba.

Guadix, A, Guadix E. M, Páez-Dueñas, M. P, González- Tello, P, y Camacho, F. (2000). *Proceso tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. Ars Pharmaceutica*, 41 (1): 79-89.

Hayakawa, S., & Nakai, S. (1985). Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *Journal of Food Science*, 50: 486-491.

Hua-Ming C., Koji M., Fumio Y., y Kiyoshi N. (1996). Antioxidant Activity of Designed Peptides Based on the Antioxidative Peptide Isolated from Digests of a Soybean Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(9): 932-938.

Huang, D.; Ou, B. y Prior, R. L. (2005). Reviews. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1841-1856.

Hook, V. Y. H.; Burton, D.; Yasothornsrikul, S.; Hastings, R. H. y Deftos, L. J. (2001). Proteolysis of ProPTHrP (1-14) by "Prohormone Thiol Protease" at multibasic residues generates PTHrP-Related peptides: Implications for PTHrP peptide production in lung cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 285: 932-938.

Jae, J. Zhong, J. Q. Hee, B. G. y Se, K. K. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*. 42: 840-846.

Kato A., Matsuda T., Matsudomi N., y Kobayashi K. (1984). Determination of Protein Hydrophobicity Using a Sodium Dodecyl Sulfate Binding Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 10: 22-27.

Li, G. H., Le, G. W., Liu, H., y Shi, Y. H. (2005). Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity. *Food Science and Technology International*, 11: 281-287.

Lo, W. M. Y., & Li-Chan, E. C. Y. (2005). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from in vitro pepsin-pancreatin digestion of soy protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3369-3376.

Marcone, M. F., & Kakuda, Y. (1999). A comparative study of the functional properties of amaranth and soybean globulin isolates. *Nahrung*, 43, 368-373.

Martínez E. N., Castellani O. F., Añón M.C (1997). Common molecular features among amaranth storage proteins. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 45, 3832-3839.

Millán, F. Los hidrolizados en alimentación: suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional *Agro CSIC* 3-8.

Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan V. y Milner A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. 84: 407-412.

Ortiz H. A. (2010). Evaluación de la capacidad antioxidante de hidrolizados enzimáticos del grano de amaranto *Amaranthus hypochondriacus L.* (Tesis de Especialización en Biotecnología). UAM, México.

Padhye, V.W. y Salunke, D.K. (1977). Biochemical studies on black gram (*Phaseolus mungo*): solubilization and electrophoretic characterization of the proteins. *Journal Food Biochemistry*. 1: 111-129.

Paredes López, O, Guevara Lara, F y Bello Pérez, L. Amaranto. 1994 En: *Los alimentos mágicos de las culturas indígenas Mesoamericanas*. México. Fondo de Cultura Económica.

Paredes López, O. 1997 Biochemistry of Amaranth Proteins. En: *Amaranth: Biology, Chemistry and Technology*, USA. CRC.

Qian Liu, Boahua Kung, Youling L. Xiung, Xiufang Xia. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. 118: 403-410.

Reis, M. J. L.; Tóth, I. V. y Rangel, A. O. S. S. (2005). A new approach for the sequential injection spectrophotometric determination of the total antioxidant activity. *Talanta*. 68(2): 207-213.

Shimada K., Fujikawa K., Yahara K., y Nakamura T. (1992). Antioxidative properties of xanthium on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6): 945-948.

Solís-Oba, M. (2005). Estudio del mecanismo de acción del ABTS y la lacasa para la oxidación de compuestos orgánicos. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.

Soriano-Santos, J., Iwabuchi, S., & Fujimoto, K. (1992). Solubility of amaranth seed protein in sodium sulphate and sodium chloride: The main factor in quantitative extraction for analysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 27: 337-346.

Soriano, J. S.; Ugalde, V. B. y Guerrero, I. L. (2008). A new enzymatic method to assess the total antioxidant activity in foods by using laccase: a polyphenoloxidase. *3^{ed} International Congress Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries*. Queretaro, Qro. México.

Tovar-Pérez, E. G., Guerrero-Legarreta, I., Farrés-González, A., & Soriano-Santos, J. (2009). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chemistry*, 116: 437-444.

Uchida, K. y Kawakishi, S. (1992). Sequence-dependent reactivity of histidine-containing peptides with copper (II)/ascorbate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40(1): 13-16.

Valeria A. Tironi, María C. Añón. (2010). Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides. Effect of proteolysis. *Food Research International*. 43:315-322.

Vioque, J., Clemente. A., Pedroche, J., Yust, M. M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos. *Grasas y Aceites*, 52: 132-136.

Zhengjun X., Junrong H., Xueming X. y Zhengyu J. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*. 111: 370-376.