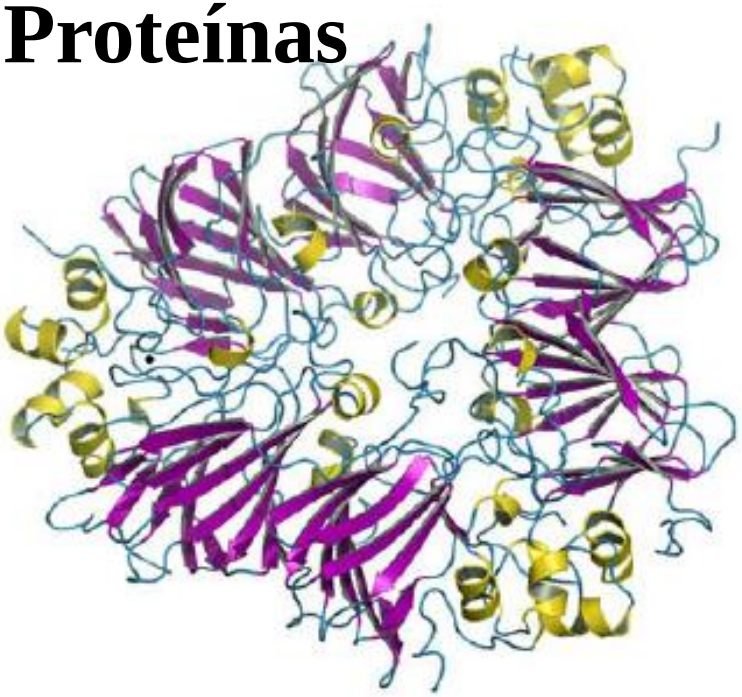
Péptidos Bioactivos y su Potencial Obtención y Uso de las Proteínas de Quinua

Rancagua, 29 de agosto de 2017

Patricio Carvajal Rondanelli, *Ph.D*

¿Cuál es su **función**?

Proteínas



Propiedades nutricionales

AA esenciales

Propiedades funcionales

Gelificación

Emulsión

Espumación

Hidratación

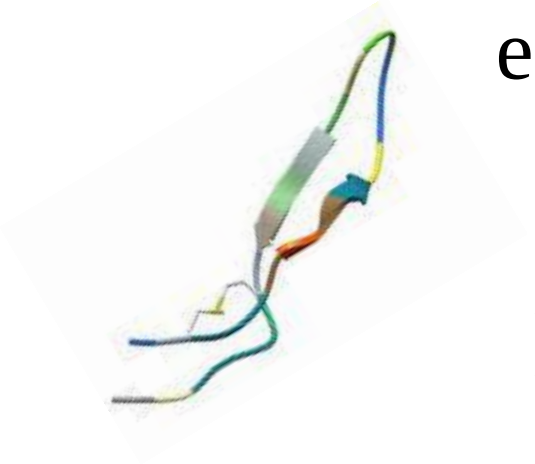
Propiedades biológicas

Actividad biológica en el organismo

Obtención de nuevos Alimentos

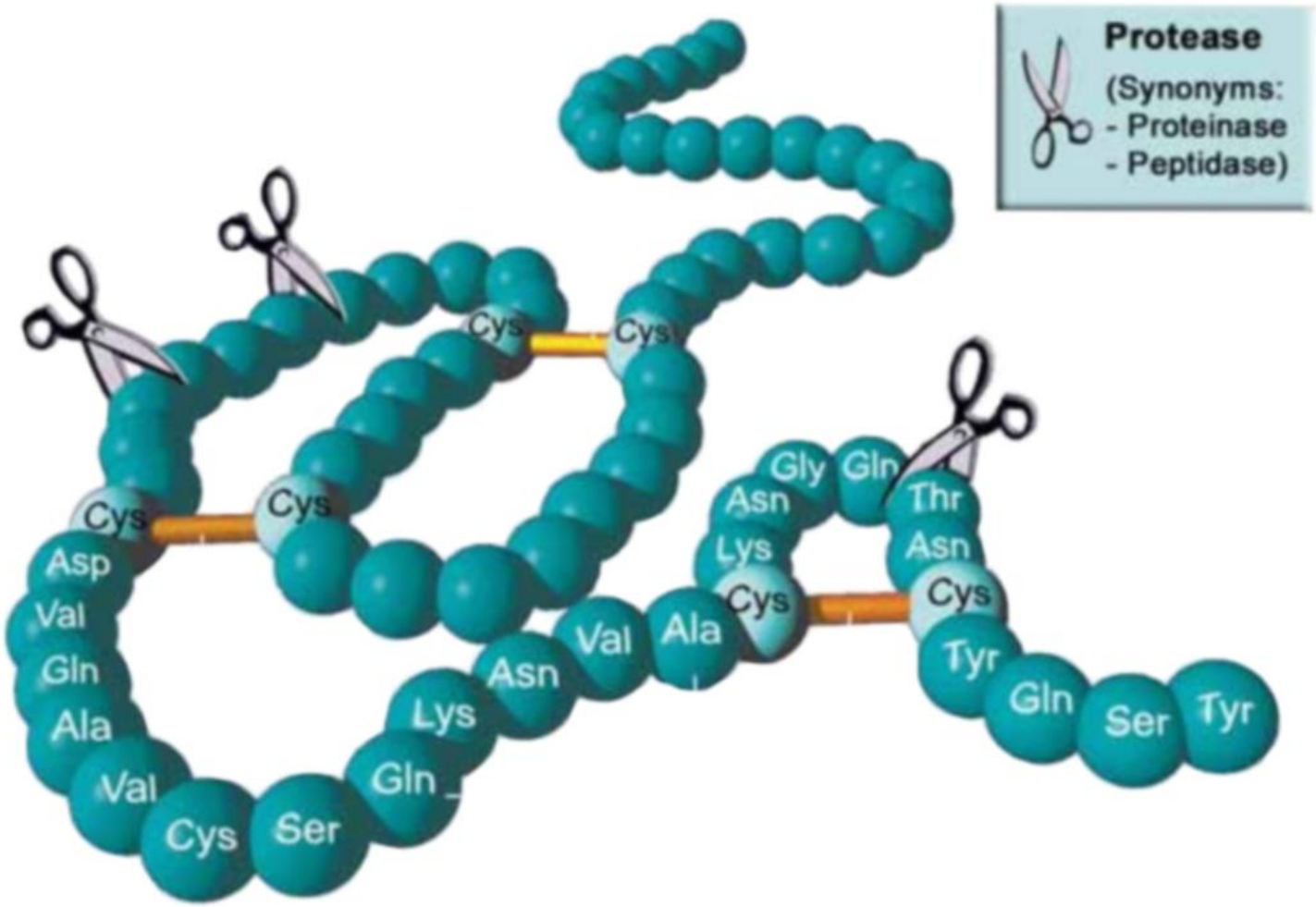
La creación actual de nuevos alimentos - basada en la producción de **alimentos funcionales** – emergen como respuesta a la creciente preocupación de la población por una **mejora en su estado de salud**.

¿Qué son los péptidos bioactivos?

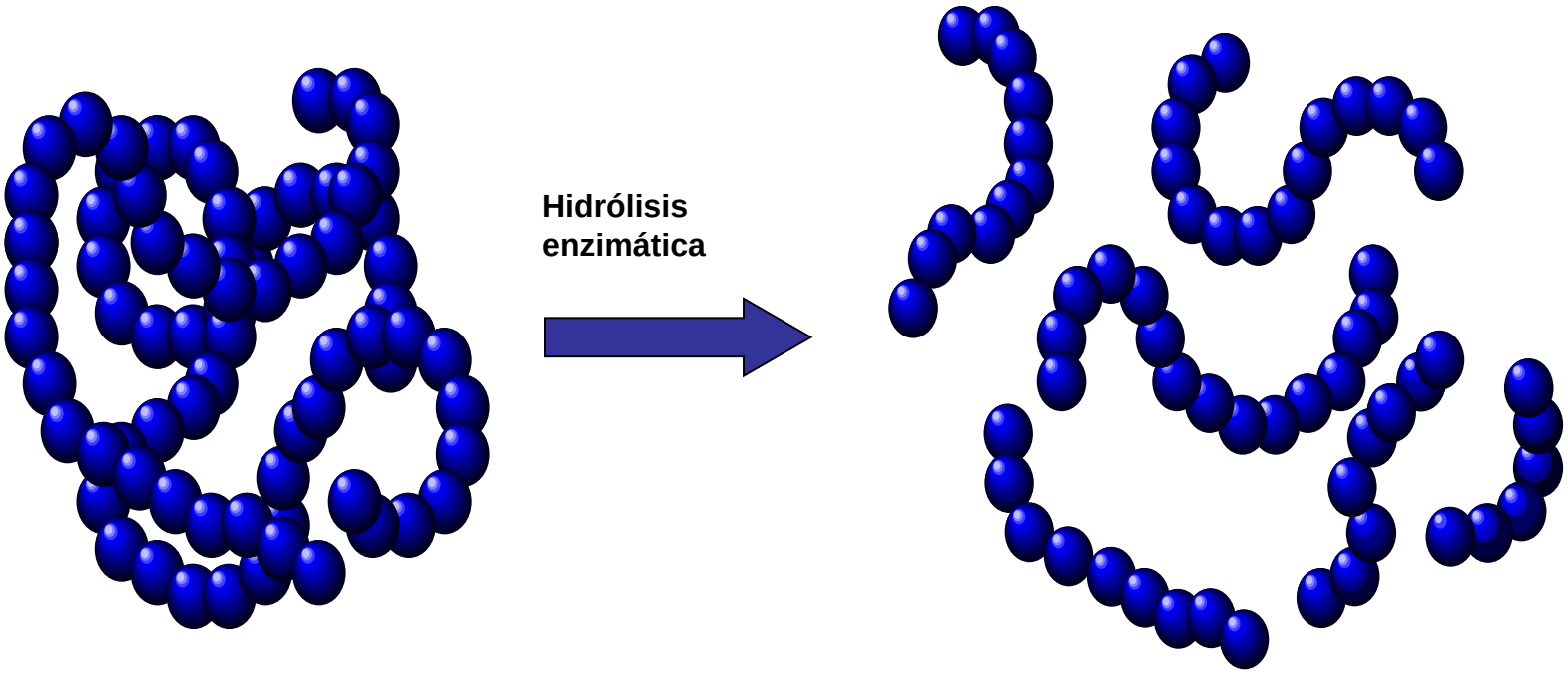


- Fragmentos proteicos encriptados en una proteína de origen
- Inicialmente en un estado inactivo
- Su secuencia primaria determina su actividad

Hidrólisis Enzimatica de Proteínas



Obtención de diferentes fracciones de péptidos a través de la hidrólisis enzimática



Proteínas y Péptidos

Propiedad Funcional	Tipo de Propiedad	Ejemplos
Tecnico-funcional	Solubilidad	Solubilidad Precipitación
	Reológica	Espesamiento Gelificante Texturizante
	Surfactante	Emulsificante Espumante
	Sensorial	Gusto Amargor Textura
	Fisico-químico	Anticongelante**
Bio-funcional	Nutricional	Disponibilidad AA esenciales Digestibilidad
	Saludable	Actividad Antimicrobiana **, Antihipertensiva**, Antiobesidad, Inmunomodulatoria, Antioxidante.
	Antibiofuncional	Alergenos

Características de péptidos bioactivos

- ✓ Poseen entre 2 a 20 residuos
- ✓ Actúan como moduladores y compuestos regultorios.
- ✓ Su actividad es función de la composición de aminoácidos y la secuencia.
- ✓ En la base BIOPEP hay 1968 péptidos bioactivos de distinto origen.

En las últimas décadas, varios estudios han establecido que los péptidos bioactivos poseen cierta bio-funcionalidad, y por lo tanto, tienen efectos terapeúticos en sistemas corporales (Korhonen & Pihlanto, 2006)

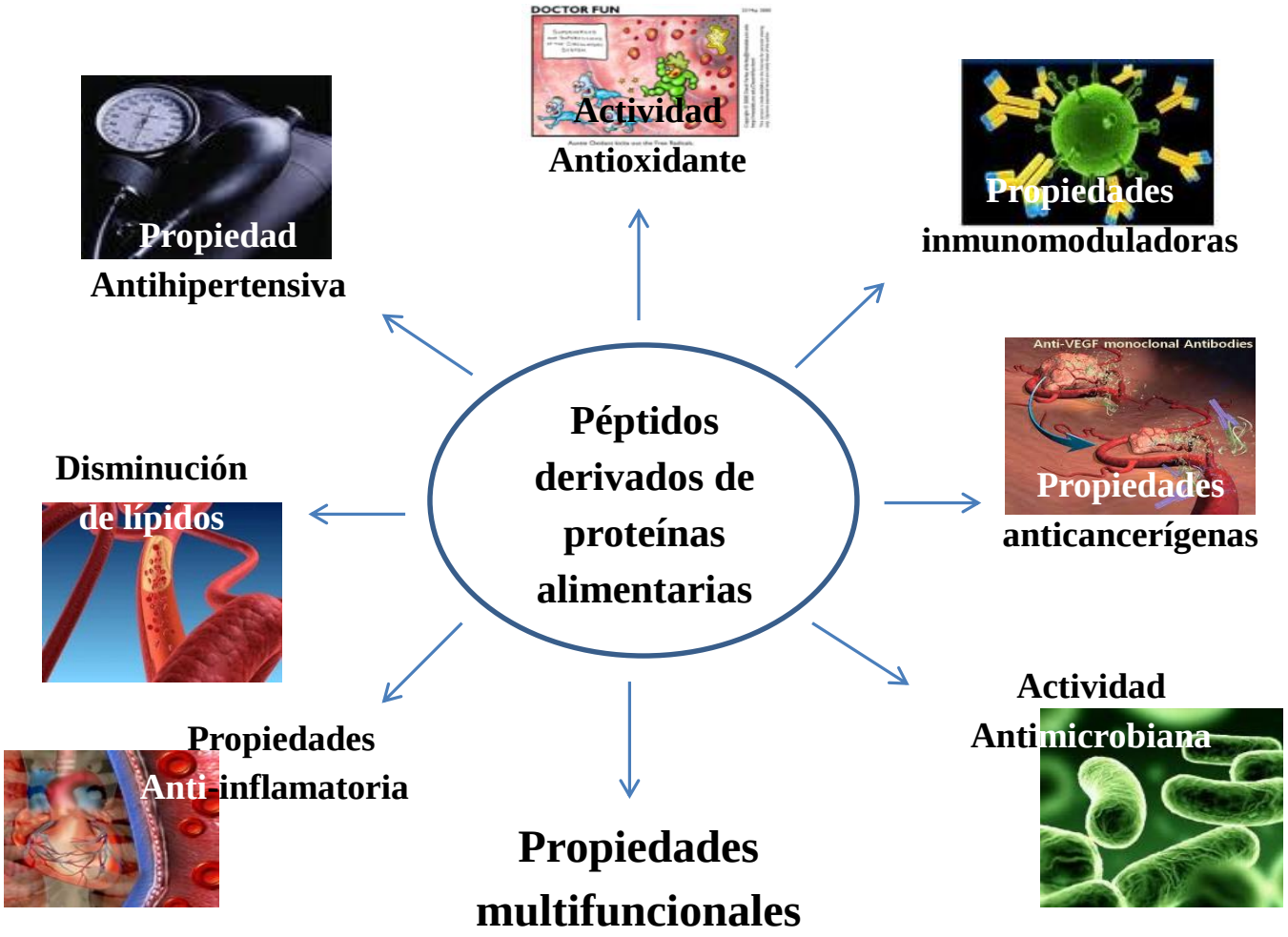
Fuentes alimenticias de péptidos bioactivos

Lácteos

Productos marinos

Productos vegetales

Propiedades bioactivas de péptidos derivados de proteínas alimentarias importantes en la promoción de la salud y prevención de enfermedades.

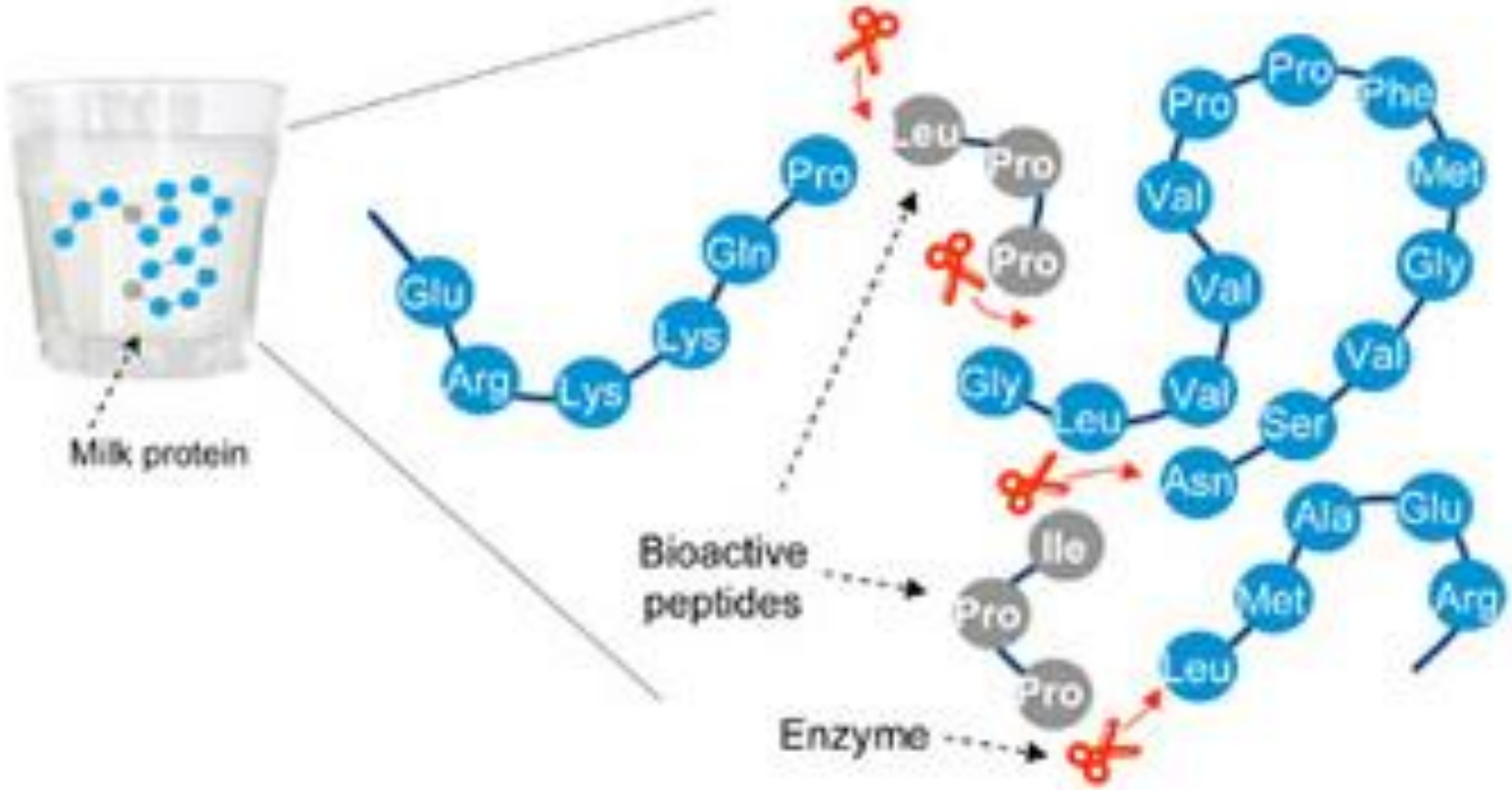


Fuente: Udenigwe & Aluko, 2012

Péptidos bioactivos y sus efectos beneficos

Péptidos	Efecto beneficioso
Inmunomoduladores	Estimulan la respuesta inmune
Inhibidores del enzima convertidor de angiotensina	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares/hipertensión
Antioxidantes	Previenen enfermedades degenerativas y envejecimiento
Reguladores del transito intestinal	Mejoran la digestión y absorción
Reguladores de la proliferación intestinal	Reducen la proliferación de tumores cancerígenos
Antimicrobianos	Reducen el riesgo de infecciones
Hipocolesterolémicos	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Anticoagulantes	Reducen los riesgos de padecer trombos

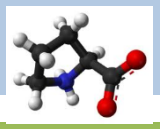
Péptidos bioactivos de la leche



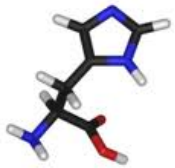
Péptidos bioactivos obtenidos desde proteínas de origen lácteo

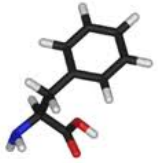
Proteína (fuente*)	Secuencia de Aminoácidos	Actividad funcional	Sistema enzimático
α-caseína[a]	Tyr-Lys-Val-Pro-Glu-Leu	ACE-Inhibitoria	Proteinasa de *Lactobacillus helveticus* CP790
para-κ-caseína[a]	Phe-Phe-Ser-Asp-Lys	Inmunomodulador	Tripsina
κ-caseína **	Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asp-Gln-Asp-Lys	Antitrombótico	Digestión gastrointestinal
β-lactoglobulina	Ile-Ile-Ala-Glu-Lys	Hipocolesterolémico	Tripsina
β-casomorfina	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu	Disminución de proliferación de linfocitos Aumento de resistencia a la infección por *Klebsiella pneumonia* en ratas	Tripsina
β-lactoglobulina[b]	Tyr-Val-Glu-Glu-Leu, Met-His-Ile-Arg-Leu, Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile	Antioxidante	Termolisina

Propiedades estructurales de ciertas funciones biológicas



Actividad	Elementos estructurales	Comentarios
Inhibidor de ECA	Pro o Hyp en el C-terminal	Usualmente resistente a la degradación por enzimas digestivas
	Pro, Lys o Arg en el C-terminal	Potencia la actividad inhibitoria de la ECA
Antioxidante	Alta cantidad de His y aminoácidos hidrofóbicos	Potencian la actividad antioxidante
	Péptidos con secuencias His-His	Muestran una gran actividad antioxidante
Antitromboticos	Ile, Leu, Asp	Favorece la acción antitrombótica
Antiobesidad	Múltiples residuos de Arg	
Antimicrobianos	Múltiples residuos de lisina/arginina y aminoácidos hidrofóbicos aromaticos	Eliminan microorganismos patógenos y resistentes a los antibióticos comunes





Péptidos Antihipertensivos

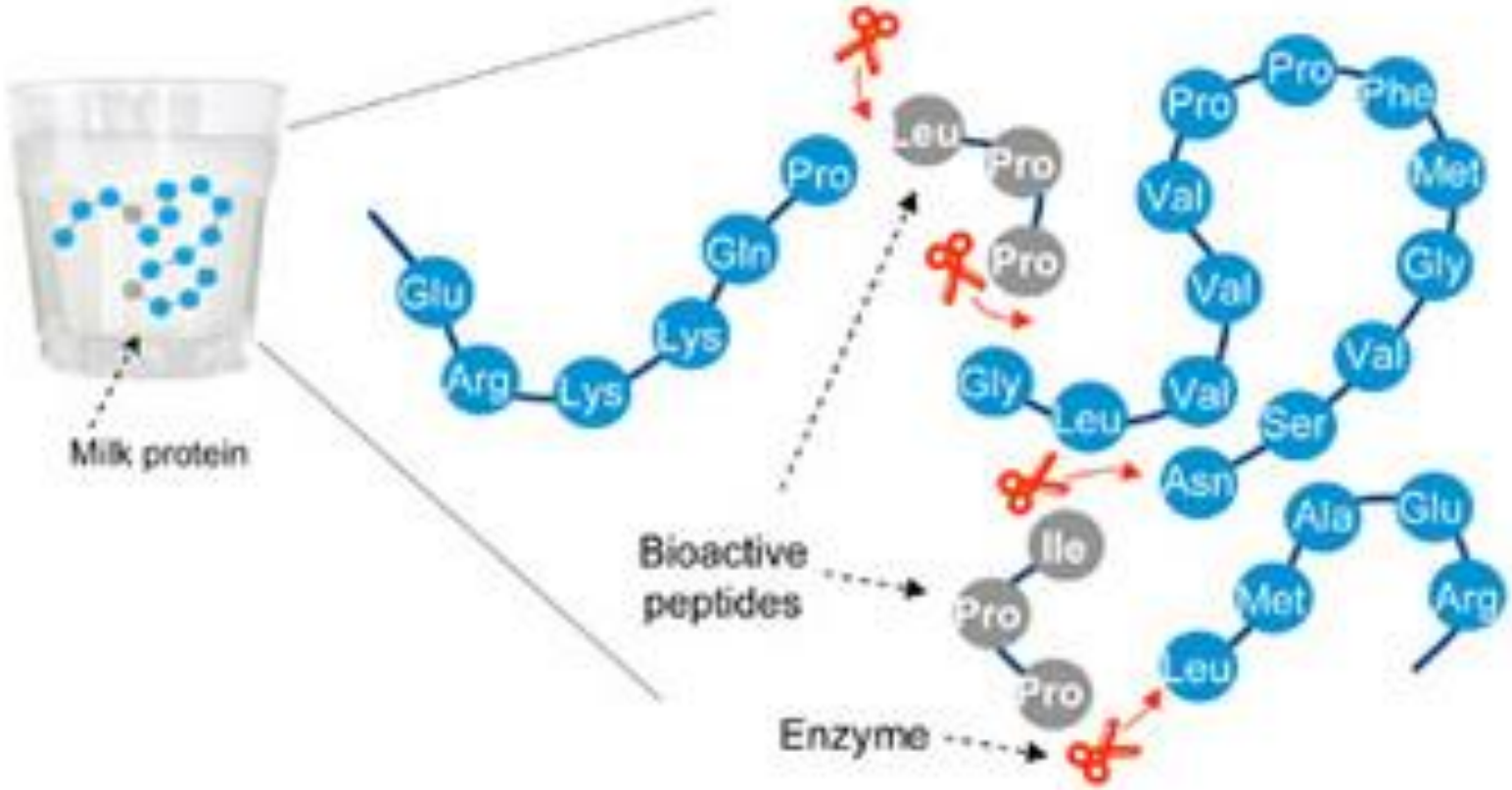
Incidencia de Hipertensión

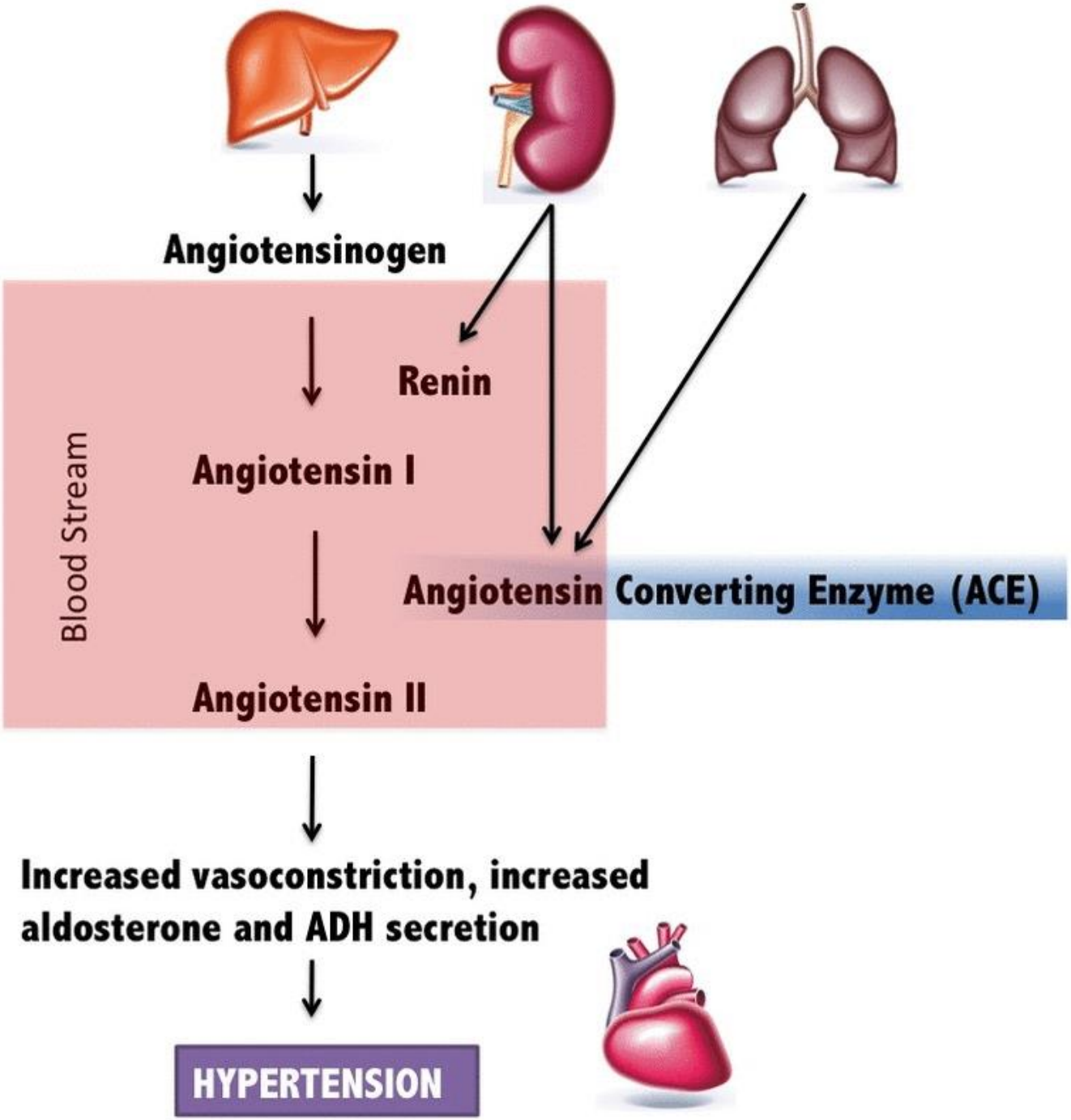
- ✓ *En Chile la hipertensión es la principal causa de morbimortalidad y el factor de riesgo de mayor carga atribuible para la patología cardiovascular isquémica y el accidente cerebrovascular.*

- ✓ La Hipertensión Arterial (HTA) es considerada por la Organización Mundial de la Salud como la primera causa de muerte a nivel mundial, con cifras cercanas a 7 millones de personas al año.

- ✓ Afecta aproximadamente a uno de cada cuatro adultos y reduce la esperanza de vida entre 10 y 15 años y en Chile la prevalencia de HTA de 33,7%, es decir uno de cada tres adultos la presenta (Encuesta Nacional de Salud, 2015)

Péptidos bioactivos de la leche




Angiotensinogen
Renin
Blood Stream
Angiotensin I
Angiotensin Converting Enzyme (ACE)
Angiotensin II
Increased vasoconstriction, increased aldosterone and ADH secretion
HYPERTENSION

Actividad inhibidora de ACE de proteinas lácteas

Protein	Peptide fragment	Primary Sequence[1]	ACE[2] IC_{50}[3]
			µmol/L
Casokinins			
α_{s1}-casein	f(25–27)	VAP	2.0
α_{s2}-casein	f(174–179)	FALPQY	4.3
β-casein	f(74–76)	IPP	5.0
κ-casein	f(185–190)	VTSTAV	52.0
Lactokinin			
α-lactalbumin	f(104–108)	WLAHK	77.0
β-lactoglobulin	f(142–148)	ALPMHIR	42.6
BSA[4]	f(208–216)	ALKAWSVAR	3.0

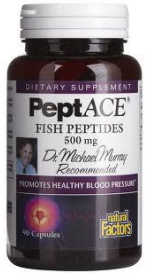
(Richard et al., 2004)

Productos comerciales antihipertensivos

Nombre del Producto	Empresa Productora	Tipo de Alimento	Péptidos Bioactivos
Calpis AMEEL S (Japón) o Calpico (Europa)	Calpis Co. (Japón)	Leche amarga	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro desde β- y κ-caseína
Evolus	Valio (Finlandia)	Leche fermentada enriquecida con calcio	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro desde β- y κ-caseína
BioZate	Davisco (USA)	Hidrolizado de β-lactoglobulina	Péptidos desde suero lácteo
C12 Peption	DMV (Holanda)	Ingrediente alimentario	Dodecapéptido derivado de caseína (Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys)
Peptide Soup	NIPPON (Japón)	Sopa	Péptidos derivados de Bonito (origen marino)
Casein DP Pepto Drink	Kanebo (Japón)	Bebida suave	Dodecapéptido derivado de caseína (Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys)

Otros Productos Comerciales

Nombre del Producto	Empresa Productora	Tipo de Alimento	Péptidos Bioactivos	Beneficio a la Salud
BioPURE GMP	Davisco (USA)	Hidrolizados de proteína de suero	Glicomacropéptido	Anticancerígeno, antimicrobiano y antitrombótico.
Cholesteblock	Kyowa Hakko (Japón)	Bebida en polvo	Péptidos de soya enlazados a fosfolípidos	Hipocolesterolémico
Glutamin Peptide WGE80GPA WGE80GPN WGE80GPU	DMV (Holanda)	Hidrolizado de proteína de leche seca	Péptidos ricos en Glutamina	Inmunomodulador



En Chile la primera causa de muerte es la enfermedad isquémica del corazón, seguida de ECV (48,9 y 47,3 muertes por 100 mil habitantes, respectivamente).
Fuente: Series guías Clínicas MINSAL, 2010

Efectos in vivo de los péptidos lácteos inhibidores de la ACE

Muestra	Dosis	Duración	DBP	SBP	
Caseina hidrolizada	20g/día	4 semanas	-4.6	-6.6	Sekiya *et al*., 1992
α-S1 caseina	> 0.2g/kg	4 semanas	-6.5	-4.5	Nimmaguda *et al*., 2000
Leche fermentada	95 ml/día	8 semanas	-6.9	-14.1	Hata et al., 1996
Leche fermentada	150 ml/día	5 meses	-9.3	-15.4	Seppo *et al*., 2003
Hidrolizado de proteínas séricas	20g/día	6 semanas	-7.0	-11.0	Pins y Keenan, 2002, 2003

Péptidos Bioactivos

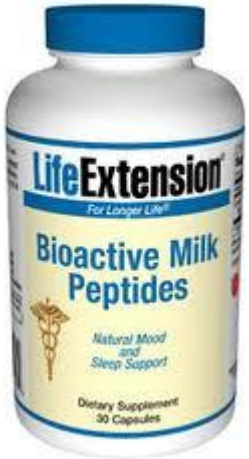
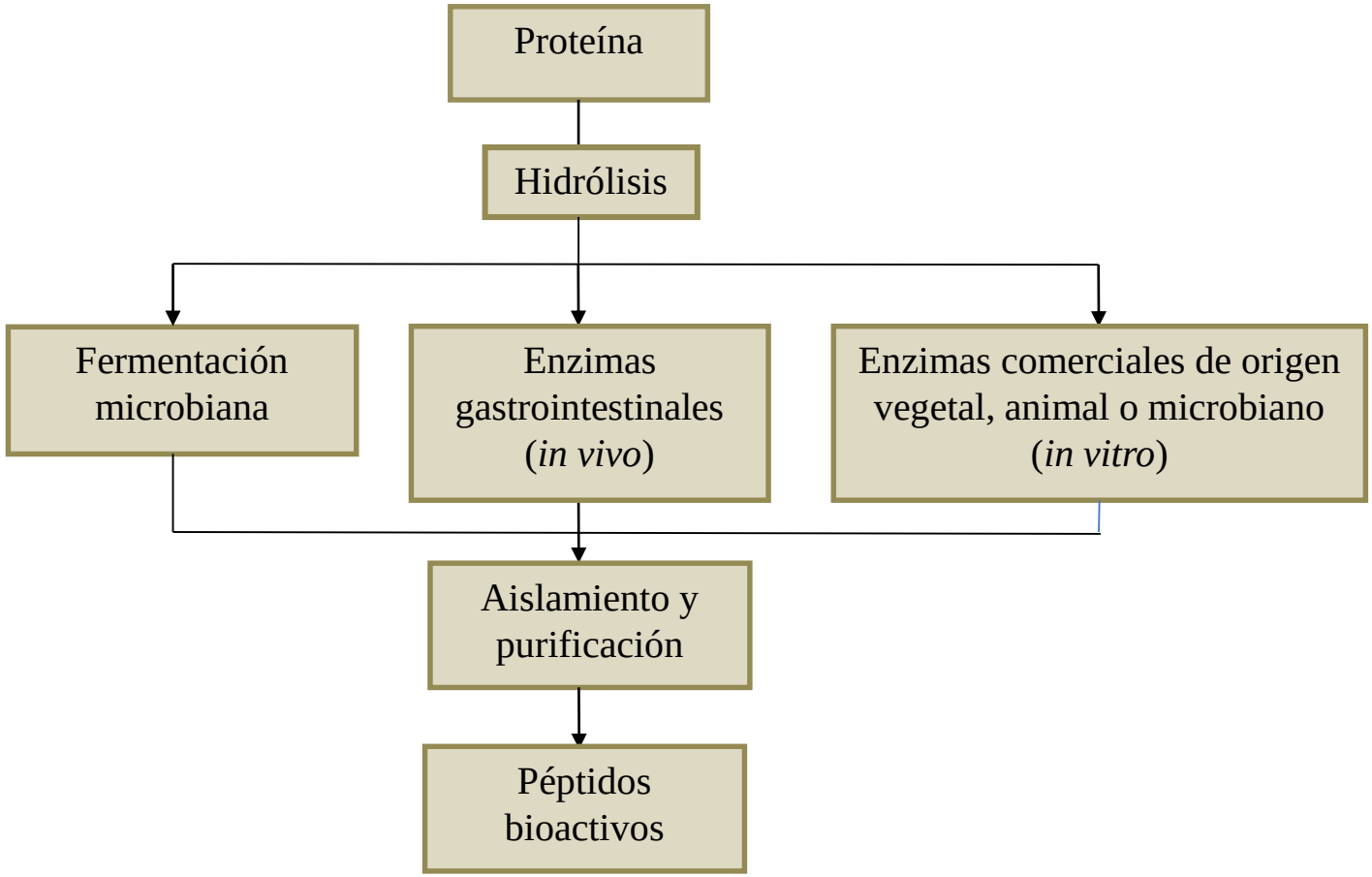


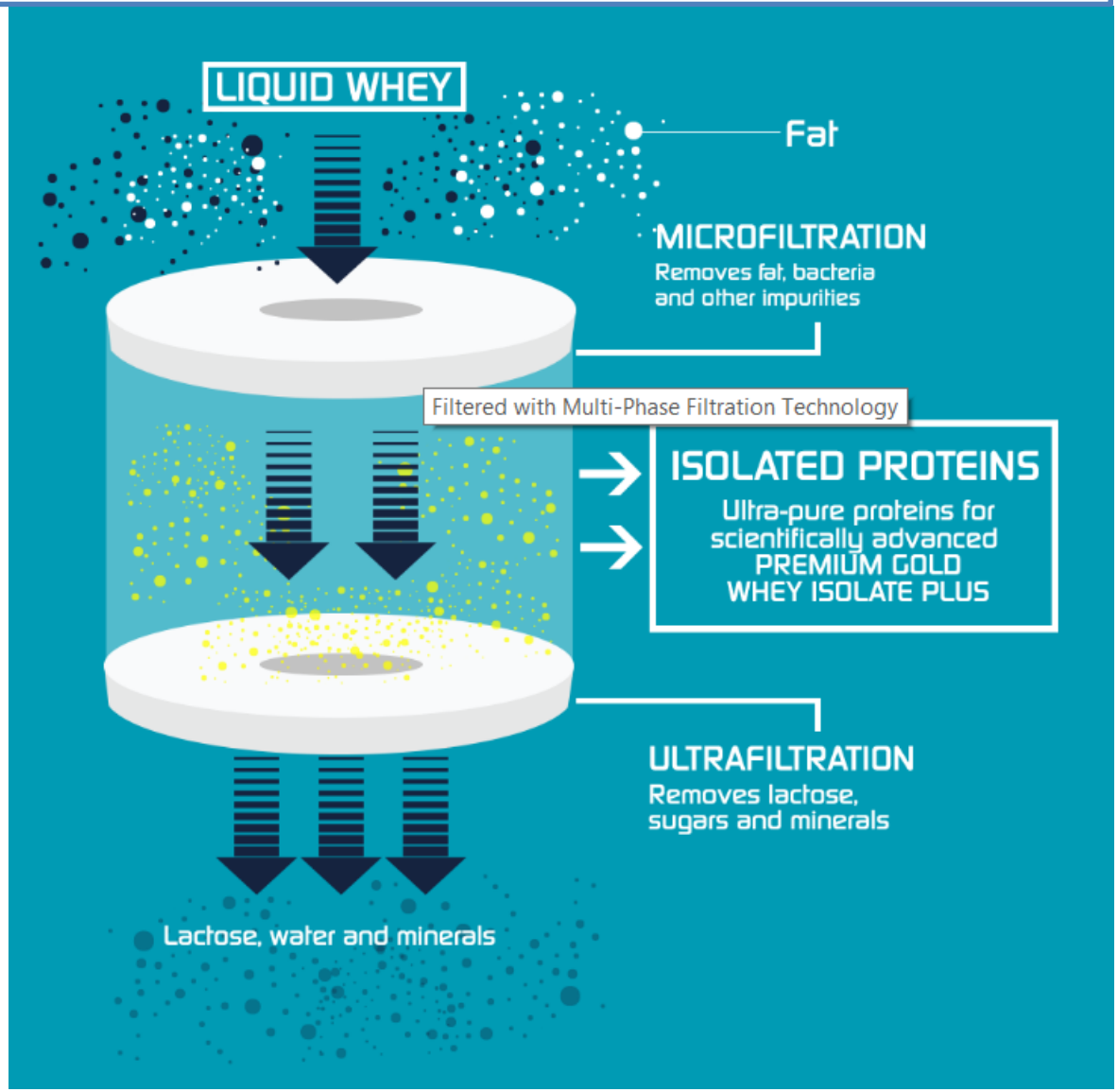
Figura 1.Productos alimenticios y de higiene bucal incorporados con péptidos con actividad antitrombótica y anticariogénica

¿De que manera pueden obtenerse?

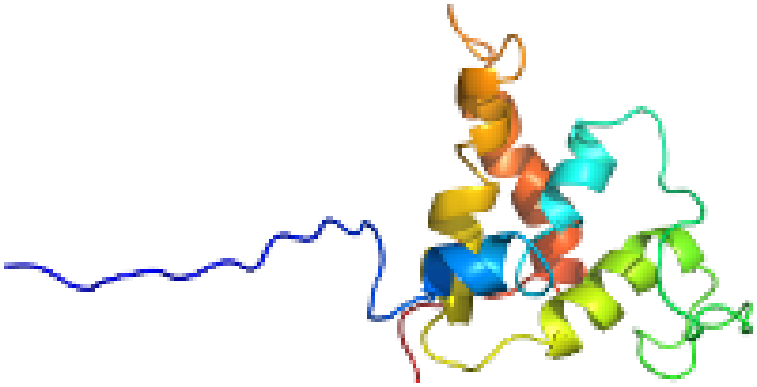


Fuente: Agyei & Danquah, 2011

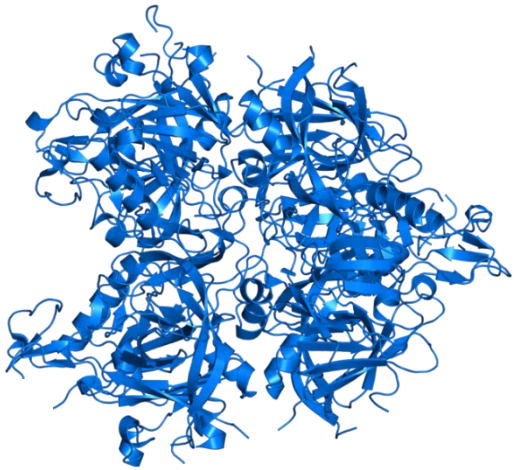
Aislación y Purificación de Péptidos Bioactivos



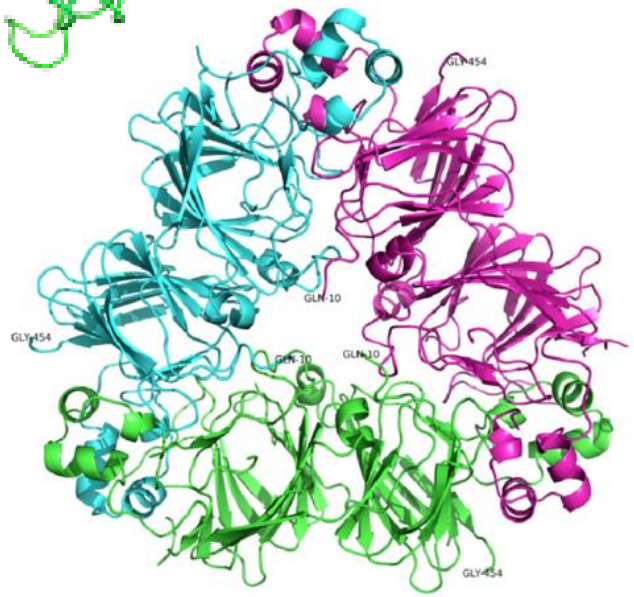
Proteínas de la Quinua



Albumina 2S
(20 Kda)



Globulina 7S

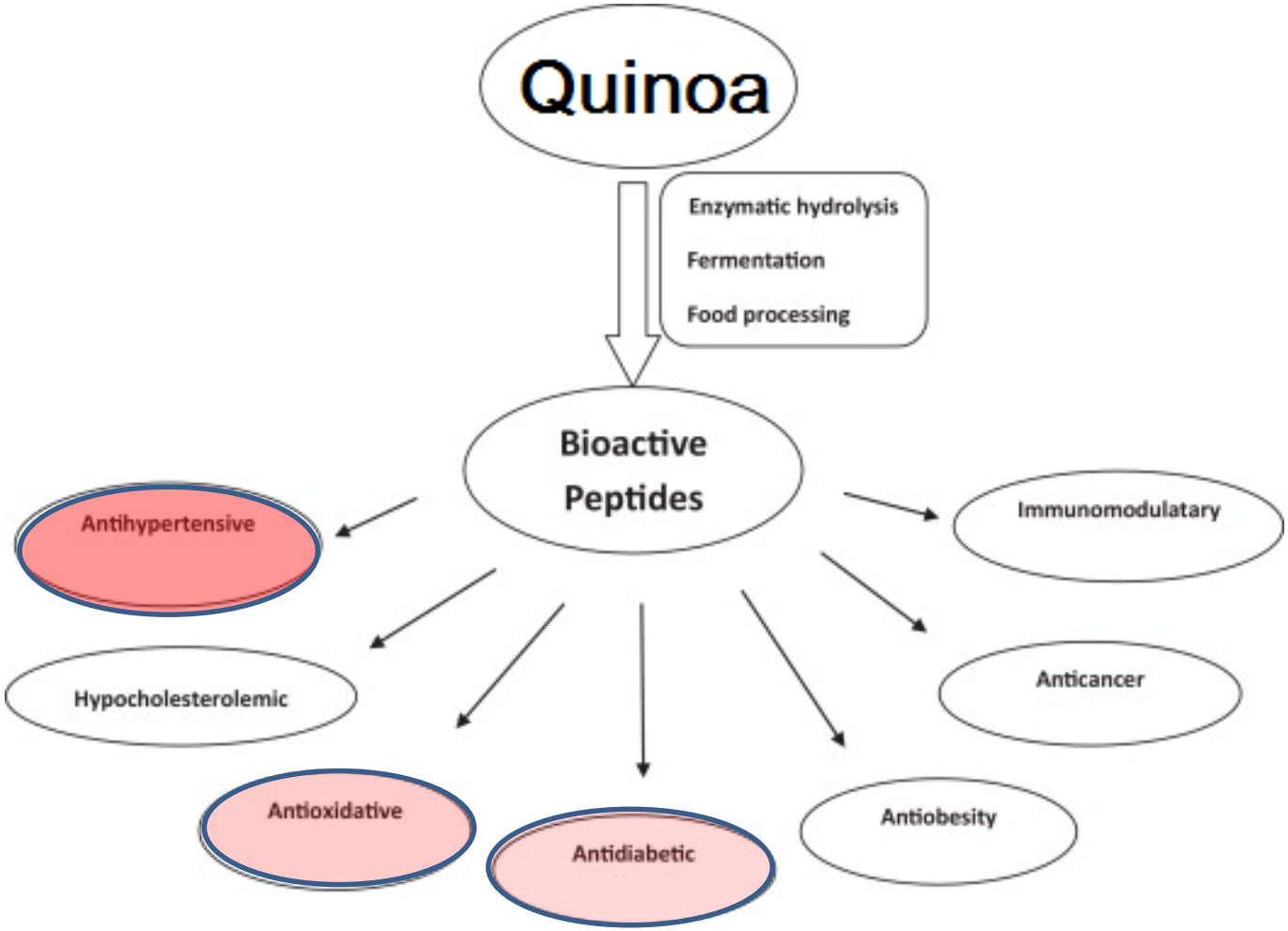


Globulina 11S (50 Kda)

Perfil Aminoacídico de Proteína de Quinua Chilena

	Aminoácido	g/100 g proteína
1	Acido Glutámico (Glu)	9.46
2	Treonina (Thr)**	8.89
3	Ácido Aspártico (Asp)	4.70
4	Glicina (Gly)	3.44
5	Arginina (Arg)**	2.98
6	Leucina (Leu)	2.52
7	Lisina (Lys)**	2.36
8	Alanina (Ala)	2.24
9	Prolina (Pro)	1.84
10	Serina (Ser)	1.77
11	Histidina (His)**	1.71
12	Fenilalanina (Phe)**	1.53
13	Tirosina (Tyr)	1.14
14	Triptofano (Trp)**	1.07
15	Valina (Val)**	0.75
16	Isoleucina (Ile)**	0.75
17	Metionina (Met)**	0.69
18	Cisteina (Cys)	0.12

Quinoa (grano oscuro), variedad Regalona cultivadas entre primavera y verano del año 2010-2011 en invernadero a 22 °C en Chillan y cosechada en enero.


Quinoa
Enzymatic hydrolysis
Fermentation
Food processing
Bioactive Peptides
Antihypertensive
Immunomodulatary
Hypocholesterolemic
Anticancer
Antioxidative
Antidiabetic
Antiobesity

Actividad Antioxidante de Hidrolizados de Proteínas de Pseudocereales y Cereales

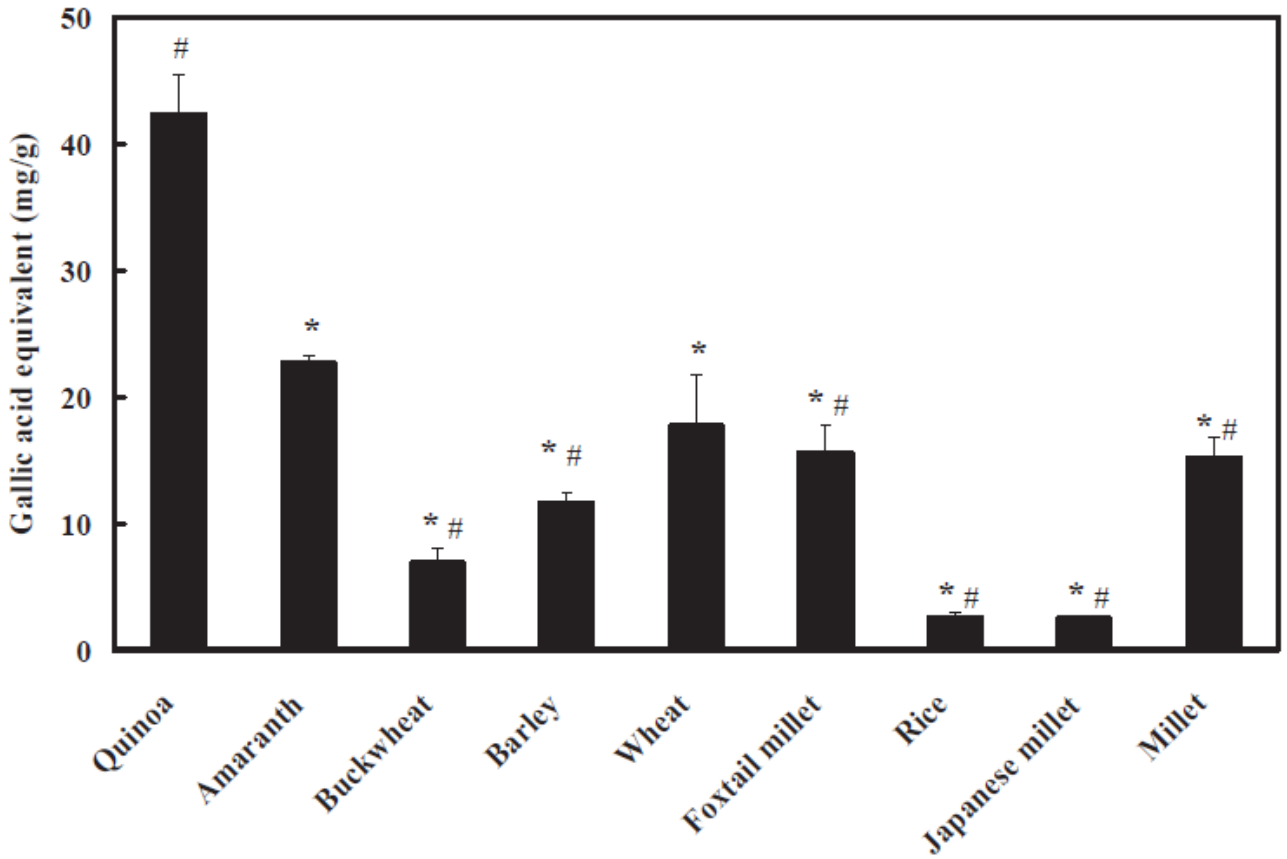


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of pseudocereals and cereals. Vertical bars represent the standard deviation (n=5). Marks following the values indicate significant differences at $P < 0.05$. *Significant difference from quiona. #Significant difference from amaranth.

Péptidos Secunciados de la Quinoa con Actividad Antioxidante

Table 2
Sequences of peptides contained in the purified fraction qf2 of the water/salt-soluble extract obtained from quinoa dough fermented at 37 °C for 24 h with *Lactobacillus plantarum* T0A10.

Peptide number	Sequence[a]	Score	Calculated mass	Expected mass	Delta	Source protein NCBI accession number
1	IVLVQEG	24	757.403	756.900	−0.503	11S seed storage globulin B; ABI94736.1
2	TLFRPEN	21	870.954	869.982	−0.975	11S seed storage globulin B; ABI94736.1
3	VGFGI	19	538.834	537.682	−1.152	Salt overly sensitive; ABS72166.1
4	FTLIIN	22	719.149	719.881	0.732	Salt overly sensitive; ABS72166.1
5	LENSGDKKY	23	1053.653	1053.130	−0.523	Maturase K CCI55135.1

[a] The single-letter amino acid code is used.

Propiedad de los hidrolizados de la proteína de quinoa para reducir la glucosa sérica y actividad antioxidante

Muestra	DPP-IV IC_{50} (mg/mL)	ORAC activity (µmol T.E. g-1)
QPI control	>2.00	264.42 ± 65.31
QPH-P	0.88 ± 0.05	501.60 ± 77.34
QPH-PL	0.98± 0.04	514.36 ± 77.34

Concentración media inhibitoria para la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) y capacidad de absorción de radicales de oxigeno (ORAC) de los aislados de quinoa (QPI), de los hidrolizados de la proteína de quinoa con papaína (QPH-P) y un hidrolizado de quinua obtenido con una enzima similar a la papaína (QPH-PL). (Nongonierma et al., 2015)

Efecto Comparativo de la Inhibición de la Actividad de la ACE por péptidos de pseudocereales y cereales

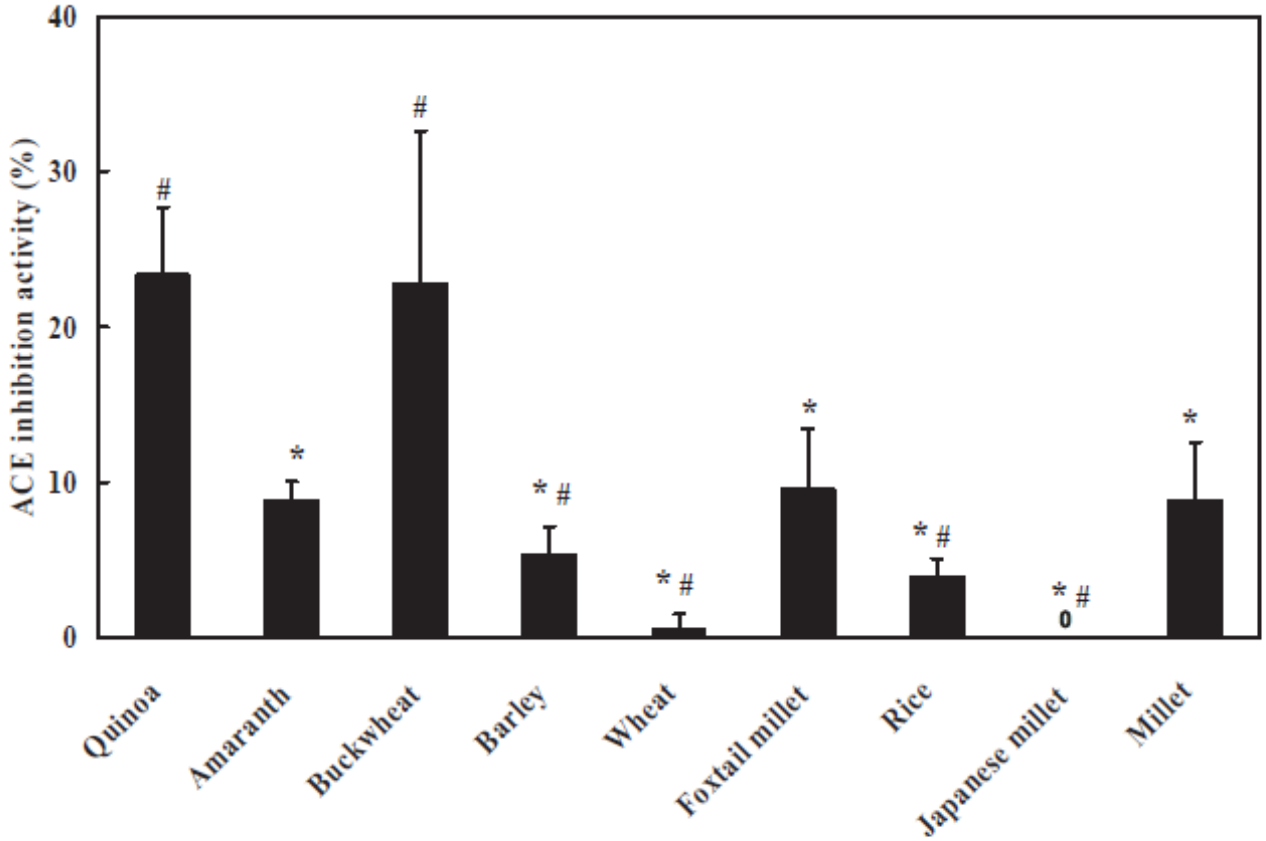


Fig. 4. ACE inhibition activity of pseudocereals and cereals. Vertical bars represent the standard deviation (n=7). Marks following the values indicate significant differences at $P < 0.05$. *Significant difference from quiona. #Significant difference from amaranth.

Estudio en Conjunto entre la Universidad de los Andes, Universidad de Santiago y Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

UdeSantiago de Chile

Universidad de los Andes

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO

Hidrolizado proteico de harina de quinua

Fraccionar péptidos por extracción en fase sólida (EFS)

Análisis

Separación por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC). Medición contenido proteico

Medición *in vitro* de actividad inhibitoria de la ECA

Fracción de péptidos con mayor bioactividad

Estudio de estabilidad a diferentes condiciones de temperatura y pH.

Estudio estabilidad a digestión *in vitro.*

METODOLOGÍA

Hidrolizado proteico de harina de quinua

Realizado en tesis de doctorado (Ciencia y Tecnología de los Alimentos, USACH) desarrollada por Adrián González en la Universidad de los Andes.

Harina de quinua → Concentrado proteico → Hidrólisis con Alcalasa → Hidrolizado proteico de harina de quinua

Tabla 1. Concentrado de proteína de quinua (base seca).

Compuesto	Porcentaje (%)
Proteína (g)	57.3
Lípidos (g)	22.7
Cenizas (g)	5.5
Extracto libre nitrógeno	14.5

METODOLOGÍA

Fraccionamiento de péptidos

Extracción en Fase sólida (EFS) por columnas C_{18}

- Técnica pretratamiento.
- Permite la aislación y fraccionamiento de péptidos desde mezclas complejas.
- Eliminar interferentes de la muestra de interés.

Razones

- Separación péptidos hidrofóbicos (Potencialmente inhibidores de la ECA)
- Técnica poco explotada en alimentos.

Concentración de proteínas de cada elución obtenida de la EFS

Fracción obtenida	Concentración proteína (mg/mL)	Fracción extraída (%)
Elución inicial de agua	1,75±0,02 [a]	23,12
Elución de 10% ACN	1,92±0,10 [a]	25,36
Elución de 20% ACN	1,45±0,03 [b]	19,15
Elución de 30% ACN	0,89±0,03 [c]	11,76
Elución de 40% ACN	0,45±0,01 [d]	5,94
Elución de 50% ACN	0,12±0,01 [e]	1,59
Elución de 60% ACN	0,08±0,01 [e]	1,06
Fase no retenida	0,91±0,01 [c]	12,02
Total	7,57	100

Actividad inhibitoria de la ECA de las fracciones obtenidas de la EFS

Fracción obtenida	% Inhibición de la ECA (0,1 mg/mL)
Hidrolizado proteíco de harina de quinua	-
Elución de agua	-
Elución de 10% ACN	30,88± 0,11 [a]
Elución de 20% ACN	12,85± 1,44 [b]
Elución de 30% ACN	11,99± 1,64 [b]
Elución de 40% ACN	-
Elución de 50% ACN	-
Elución de 60% ACN	-

Valor IC_{50} de la fracción peptídica eluida de 10% ACN

Concentración (mg/mL)	% Inhibición ECA
0,10	30,9± 0,1
0,14	50,00
0,15	57,3± 3,7

Estudio de la estabilidad de péptidos antihipertensivos de quinoa a diferentes pHs y temperaturas

Factores experimentales		Variable de respuesta
Temperatura (°C)	pH	%Inhibición ECA
60	3,50	1,38± 0,79 [a]
75	3,50	2,68± 0,61 [a]
90	3,50	1,32±1,09 [a]
60	5,25	11,28± 1,41 [b]
75	5,25	12,58± 2,10 [b]
90	5,25	9,19± 2,23 [b]
60	7,00	28,49± 0,85 [c]
75	7,00	29,94± 3,48 [c]
90	7,00	28,62± 0,3 [c]

CONCLUSIONES

- Los hidrolizados de proteínas de la quinoa tienen el enorme potencial de generar péptidos con diferentes actividades biológicas en las que se destaca su capacidad antihipertensiva, antioxidante y anti glicémica.

- Se requieren estudios "*in vivo*" para validar las potenciales actividades que presentan los péptidos derivados de hidrolizados de la proteína de la quinoa

AGRADECIMIENTOS

Proyecto **INNOVA-CORFO I+D Aplicada Línea 2** N° 13IDL2-23457 (2013-2016). Obtención de Fracciones Funcionales para la Industria y Péptidos Bioactivos de Quinua como Agentes Moduladores del Estado Fisiológico.

Grupo de trabajo:

- Patricio Fernandez (PUCV/USACH)
- Dr. Silvia Matiacevich (USACH).
- Dr. Javier Enrione (UANDES).
- Dr. Patricio Carvajal (PUCV).
- Adrián González, estudiante Doctorado en Ciencia y Tecnología de los alimentos (USACH).

UdeSantiago de Chile

Universidad de los Andes

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO