

## Obtención de hidrolizados proteicos bajos en fenilalanina a partir de suero dulce de leche y chachafruto (*Erythrina edulis* Triana)

Franklin Villafuerte,<sup>1,2</sup> Elevina Pérez,<sup>3</sup> Antonieta Mahfoud,<sup>4</sup> Yolmar Valero,<sup>1</sup> Amaury Pérez Martínez.<sup>2,5\*</sup>

**Resumen:** Obtención de hidrolizado proteicos bajos en fenilalanina a partir de suero dulce de leche y chachafruto (*Erythrina edulis* Triana). La fenilcetonuria (PKU) es causada por una actividad deficiente de la enzima fenilalanina hidroxilasa. En los pacientes con esta deficiencia la fenilalanina (Phe) no puede ser convertida en tirosina, aumentando sus niveles en sangre y de otros metabolitos neurotóxicos, provocando un retraso mental irreversible. El tratamiento fundamentalmente se basa en una dieta controlada de Phe. Sin embargo, los alimentos libres o bajos en Phe son escasos. El objetivo de esta investigación es obtener hidrolizados proteicos con bajo contenido de Phe a partir del suero dulce de leche en polvo y harina de *E. edulis* Triana. El aislado proteico (96,01% proteína cruda) se obtuvo por solubilización y precipitación de las proteínas de la harina, mientras que las proteínas del suero (15,69% proteína cruda) fueron tratadas en su matriz original. Las proteínas del suero y el aislado fueron hidrolizadas enzimáticamente con pepsina y proteasa de *Streptomyces griseus*. La concentración de Phe se determinó por fluorometría y por HPLC, de lo cual la Phe de las proteínas del suero es liberada una hora antes que las del chachafruto, debido a que las proteínas del suero en parte fueron hidrolizadas en la elaboración del queso. Además, los resultados de la utilización del carbón activados como captor de Phe indican la reducción total del contenido de este aminoácido en los hidrolizados y la reducción de la concentración de otros aminoácidos. **ALAN, 2019; 69(1): 25-33.**

**Palabras clave:** Fenilcetonuria; fenilalanina; aislado proteico; hidrolizados proteicos; *Erythrina edulis*; chachafruto.

**Summary:** Obtaining protein products low in phenylalanine from milk whey and chachafruto (*Erythrina edulis* Triana). Phenylketonuria (PKU) is caused by a low activity of the enzyme phenylalanine hydroxylase. In patients with this deficiency, phenylalanine (Phe) cannot be converted to tyrosine, increasing blood levels and other neurotoxic metabolites, causing irreversible mental retardation. The treatment is fundamentally based on a controlled diet of Phe. However, free or low-Phe foods are scarce. The objective of this research is to obtain protein hydrolysates with low Phe content from sweet milk powder and *E. edulis* Triana flour. The protein isolate (96.01% crude protein) was obtained by solubilization and precipitation of the flour proteins, while the whey proteins (15.69% crude protein) were treated in their original matrix. Serum and asylated proteins were enzymatically hydrolyzed with pepsin and *Streptomyces griseus* protease. The concentration of Phe was determined by fluorometry and by HPLC, from which the Phe of whey proteins is released one hour earlier than those of chachafruto, due to the fact that the whey proteins were partially hydrolyzed in the elaboration of the cheese. In addition, the results of the use of charcoal activated as Phe captor indicate the total reduction of the content of this amino acid in the hydrolysates and the reduction of the concentration of other amino acids. **ALAN, 2019; 69(1): 25-33.**

**Key words:** Phenylketonuria; phenylalanine; protein isolate; protein hydrolysates; *Erythrina edulis*; chachafruto.

### Introducción

Las proteínas de la dieta, son fuente de energía, aportan aminoácidos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de células y tejidos de nuestro organismo. Como consecuencia de la digestión de las proteínas se liberan péptidos, que se definen como cadenas con distintos números de aminoácidos (1). Sin embargo, en algunas condiciones como en los errores innatos del metabolismo (EIM), la consecuencia de las deficiencias

<sup>1</sup>Universidad Simón Bolívar. Caracas-Venezuela. <sup>2</sup>Universidad Estatal Amazónica. Puyo, Pastaza. Ecuador. <sup>3</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Central de Venezuela. Caracas Venezuela. <sup>4</sup>Unidad de Errores Innatos del Metabolismo. Instituto de Estudios Avanzados IDEA. Caracas. Venezuela. <sup>5</sup>Universidad de Camagüey. Camagüey. Cuba. Autor para la correspondencia: Amaury Pérez Martínez. Email: amperez@uea.edu.ec

enzimáticas congénitas provoca un bloqueo en determinada vía metabólica, por tanto, el consumo de ciertos aminoácidos puede ocasionar consecuencias patológicas en el individuo.

La fenilcetonuria, o *PKU* (por su nombre en inglés: *phenylketonuria*) es el más frecuente de los errores innatos del metabolismo de los aminoácidos. Es una enfermedad metabólica autosómica recesiva, que se debe a una actividad deficiente o inexistente de la enzima fenilalanina hidroxilasa (*PAH* por su nombre en inglés: *phenylalanine hydroxylase*). Este déficit causa una acumulación de fenilalanina (*Phe*) y un descenso de tirosina (*Tyr*) en los fluidos y tejidos biológicos, por lo que la *PKU* que no es diagnosticada ni tratada tempranamente antes del mes de vida, produce una encefalopatía irreversible cuya consecuencia más grave es el retraso (2, 3).

Uno de los tratamientos de la *PKU* consiste en regular los niveles de *Phe*, limitando su ingestión. El propósito fundamental del tratamiento es reducir y mantener las concentraciones de *Phe* en sangre para prevenir la aparición de los efectos neuropatológicos y, al mismo tiempo, asegurar un crecimiento y un neurodesarrollo apropiado de los pacientes.

Las proteínas de origen animal deben restringirse en la dieta de los pacientes con *PKU* debido a que contienen 4 a 6% de *Phe*, y con pequeñas cantidades se cubre casi la totalidad diaria recomendada de este aminoácido. Los cereales, leguminosas, frutas y verduras también contienen este aminoácido, pero en cantidades menores, por lo que se pueden incluir en la dieta de forma cuidadosa y siempre calculando el aporte total de *Phe* (2).

Para limitar la ingesta de *Phe* y al mismo tiempo proporcionar una buena nutrición, el paciente debe recibir fórmulas especiales libres o bajas en *Phe*, ricas en otros aminoácidos, vitaminas y minerales. En estas fórmulas sin *Phe* las proteínas están predigeridas mediante hidrólisis enzimática, tratamiento térmico y ultrafiltración. El sustrato más usado para la preparación de estos hidrolizados proteicos son las proteínas de la leche, es decir, caseína y proteínas del lactosuero. Esto es debido fundamentalmente, a su disponibilidad en grandes cantidades, alto valor nutricional y moderado costo del mismo (4).

Sin embargo, el principal inconveniente de los consumidores afectados por *PKU* es el acceso a proteínas libres o bajas en el contenido de *Phe* para mantener la dieta baja en este

aminoácido, ya que, en su totalidad, estos productos son importados y de costos elevados.

En la búsqueda de fuentes proteicas alternativas se encuentran las proteínas de las leguminosas, que, a pesar de ser deficientes en metionina y cisteína, tienen una calidad nutricional adecuada por su alto contenido de lisina. Entre ellas se menciona el frijol de *E. edulis* Triana, que posee un alto contenido de proteínas (20,50%). Además de tener un aminograma comparable al del huevo y superior al del frijol y la arveja (5).

El chachafruto, es una leguminosa multipropósito con un amplio espectro de usos, que van desde la alimentación humana (la semilla) y animal (el forraje) hasta la recuperación de suelos degradados (dada su capacidad de fijar nitrógeno en el suelo), pasando por la formación de cercas vivas y las asociaciones con otras especies (en muchas regiones del país se le usa para dar sombra a los cafetales) (6).

Con el fin de aprovechar materia prima tropical no convencional subutilizada, el propósito del trabajo es obtener hidrolizados proteicos con bajo contenido de fenilalanina a partir del suero dulce de leche en polvo y harina de chachafruto.

## Materiales y métodos

La materia prima usada fue suero dulce de leche en polvo de la comercializadora LGA. C.A. Venezuela y *E. edulis* Triana que se produce y cultiva en el estado Mérida, Venezuela. Las enzimas utilizadas son de Sigma-Aldrich: a) pepsina de la mucosa gástrica porcina P7000-100G; b) proteasa bacteriana Tipo XIV de *Streptomyces griseus* P5147-1G.

Caracterización proximal del suero de leche. Se realizó según los métodos descritos en las normas COVENIN (7, 8): a) Humedad; b) proteínas; c) grasa d) cenizas; e) carbohidratos-cálculo por diferencia.

Preparación y caracterización proximal de la harina de chachafruto. Se elaboró la harina de chachafruto, según el método descrito por Pérez

Sira, Lares Amaiz (9). Se cortaron los frijoles en trozos rectangulares ( $\approx 2$  cm de diámetro), y deshidrataron a una temperatura de  $45^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 24 horas, en el deshidratador de bandeja "Mitchell Dryers" modelo N° 655149. Los trozos deshidratados fueron molidos en un molino (de martillo) y la harina obtenida fue envasada en frascos de vidrio.

La caracterización química de la harina de chachafruto se realizó de acuerdo a las normas COVENIN (7,10): a) humedad; b) proteínas; c) grasa; d) cenizas; e) carbohidratos-estimado por diferencia.

Obtención de aislados proteicos de harina de chachafruto por precipitación del punto isoelectrico. El aislado proteico se obtuvo por extracción alcalina y precipitación en el punto isoelectrico de la proteína, al modificar el método propuesto por (11).

La harina fue dispersada en agua destilada (1:10 p/v) y el pH ajustado a 11,0 con NaOH 0,1 M, a fin de facilitar la solubilización de la proteína. La dispersión se mantuvo bajo agitación durante 1 hora, al cabo de este tiempo se centrifugó la dispersión a 2.500 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante fue separado y ajustado a pH 4 para precipitar la proteína, se agitó por una 1 hora y la proteína se recuperó por centrifugación a 2.500 rpm durante 30 minutos. Las proteínas recuperadas fueron liofilizadas y congeladas para su posterior hidrólisis.

Reducción del nivel de *Phe* de las proteínas del suero en polvo y del aislado proteico de harina de *Erythrina edulis* Triana. Para reducir el nivel de fenilalanina se utilizó y modificó la metodología propuesta por Arai, Maeda (12). Se prepararon soluciones acuosas al 5% de proteínas tanto del suero como del aislado de chachafruto y se calentaron a  $90^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, antes del tratamiento enzimático.

El proceso de hidrólisis se realizó en el fermentador *ApplikonBiotechnology* P100. Para esto la solución anteriormente calentada se enfrió a  $37^{\circ}\text{C}$ , ajustando el pH a 2.0 y añadiendo la pepsina en una proporción

1:100 (enzima:sustrato), manteniendo la temperatura del medio a  $37^{\circ}\text{C}$  por 2 h. Posteriormente se aumentó la temperatura a  $40^{\circ}\text{C}$  y el pH a 6,5 para añadir proteasa en una proporción 1:100 (enzima:sustrato), manteniendo el proceso de hidrólisis por 5 horas.

Finalizada la hidrólisis se inactivaron las enzimas aumentando la temperatura a  $90^{\circ}\text{C}$ . El hidrolizado enfriado se filtró a través de columnas de carbón activado para remover la fenilalanina. Es importante mencionar que durante el proceso de hidrólisis se tomaron muestras cada hora, con el fin de determinar la cantidad de fenilalanina liberada de las proteínas.

Cuantificación del contenido de *Phe* de los hidrolizados proteicos de suero y de chachafruto por fluorometría. El contenido de *Phe* se cuantificó utilizando el método Fluorometría desarrollado por Centro de Inmunoensayo (13). Este método consistente en impregnar papeles de filtro calibrado con los hidrolizados, que se secaron bajo campana. Una vez seco el papel de filtro de cada hidrolizado, se cortó un disco de 3 mm de diámetro y se depositó en una placa para su elusión, añadiendo 70  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se transfirió 10  $\mu\text{L}$  de los calibradores, el control y las muestras a las tiras de reacción, con una pipeta multicanal y se añade 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción (mezcla de Ninidrina, L-Leucina-L-Alanina en una solución tampón de succinato) en cada orificio y se incubaron 1 hora a  $62^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda.

Transcurrido este tiempo se añadió 10  $\mu\text{L}$  del reactivo de cobre en cada pocillo y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, la intensidad de la fluorescencia emitida en la placa se leyó en un fluorómetro PR-521 marca SUMA a una longitud de onda de 460 nm. Los valores de fluorescencia de las muestras se interpolaron en un gráfico de fluorescencia contra la concentración de *Phe* correspondiente a la curva de calibración, obteniéndose los resultados en  $\mu\text{mol/L}$  o  $\text{mg/dL}$ .

Obtención del perfil de aminoácidos del suero dulce de leche, aislado proteico de harina de chachafruto y sus respectivos hidrolizados. El perfil aminoacídico de los hidrolizados proteicos se realizó según el método descrito por Waters Associates (14), como se detalla a continuación:

La preparación de la muestra se realizó con 40 mg de proteína que fueron hidrolizadas a  $110^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas con 15 mL de HCl 6 M. Luego se aforó a 50 mL y una alícuota de 1 mL

fue filtrada a través de un filtro *Millipore*. Los hidrolizados fueron derivatizados usando fenilisotiocianato (*PITC* por su nombre en inglés: *phenylthiocarbamyl*).

Posteriormente se determinaron los perfil de aminoácidos en el HPLC de bomba binaria *Waters 1525*, acoplado a un detector de UV-Visible de onda dual *Waters 2487* empleando a una longitud de onda de 254 nm, con una columna de C18 de 150 x 3,9 mm (V0= 1,8 cm<sup>3</sup>). Se inyectaron las muestras usando una jeringa Hamilton de 50 µL, el loop de la válvula de inyección debe fue de 5 µL. Las fases móviles usadas fueron, A: constituida por un buffer de acetato a pH 5,70; B: constituida por una mezcla CH<sub>3</sub>CN – H<sub>2</sub>O (60-40) a un flujo de 1,0 mL/min. Cada corrida cromatográfica se llevó a cabo en un lapso de 45 minutos a una temperatura de 40 °C (14).

#### Análisis estadísticos.

Los resultados se presentan como el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar. La comparación de los perfiles de aminoácidos del suero dulce de leche, aislado proteico de harina de chachafruto y con los respectivos hidrolizados fueron analizados con la prueba t de *Student* para determinar diferencias significativas en el contenido de aminoácidos.

### Resultados

*Composición del suero de leche en polvo.* En la Tabla 1, se presentan los resultados obtenidos de humedad, proteína cruda, grasa cruda y carbohidratos del suero dulce de leche en base seca y base húmeda, donde el mayor contenido corresponde a carbohidratos.

**Tabla 1.** Composición proximal del suero dulce de leche.

Contenido	Datos experimentales		Arcila y mendoza (2006)	
	Base húmeda (%)	Base seca (%)	Base húmeda (%)	Base seca (%)
Humedad	1,81 ± 0,11	0,00	3,15	0,00
Proteína cruda	15,40 ± 0,28	15,69	12,88	13,15
Grasa cruda	0,36 ± 0,02	0,37	0,5	0,51
Carbohidratos	76,43 ± 0,00	77,85	76,26	77,85
Cenizas	7,80 ± 0,01	7,94	7,21	7,36

*Preparación y caracterización de la harina de harina de chachafruto.* El rendimiento del proceso de obtención de la harina del chachafruto fue de 18,85%. Este valor es bajo y se debe al alto contenido de humedad en el grano fresco (81,5%).

En la Tabla 2 se reporta la cantidad porcentual de humedad, proteína cruda, grasa cruda, y carbohidratos de la harina de chachafruto, donde se observa un predominio de carbohidratos y proteínas.

*Obtención del aislado proteico de harina de chachafruto por precipitación del punto isoeléctrico.* La disponibilidad en grandes cantidades de fuentes proteicas vegetales, su menor costo comparado con la proteína de origen animal y la tendencia a reducir la ingesta de proteínas animales por razones de salud hace que en los últimos años se esté produciendo un gran desarrollo en los procesos de extracción y mejora de estas proteínas vegetales para su uso en alimentación humana. En la Tabla 3 se presenta el valor de la concentración del contenido de proteína aislada de la harina de chachafruto. Este valor es elevado al observar los datos en base seca y base húmeda.

*Reducción y cuantificación del nivel de Phe de las proteínas del suero y aislado de chachafruto tratadas enzimáticamente.* Para reducir el contenido de *Phe* de las muestras de suero y aislado proteico de harina de chachafruto se requiere hacer una ruptura de las proteínas mediante hidrólisis enzimática, para exponer los aminoácidos y facilitar su remoción. Considerando que la hidrólisis se realizó en dos etapas: a) 2 horas con pepsina de mucosa gástrica

**Tabla 2.** Composición proximal de la harina de chachafruto.

Contenido	Base húmeda (%)	Base seca (%)
Humedad	2,04 ± 0,22	0,00
Proteína cruda	25,66 ± 0,15	26,19
Grasa cruda	1,00 ± 0,02	1,02
Carbohidratos	68,76 ± 0,00	70,19
Cenizas	4,58 ± 0,21	4,68



**Tabla 3.** Contenido de humedad del aislado proteico de chachafruto.

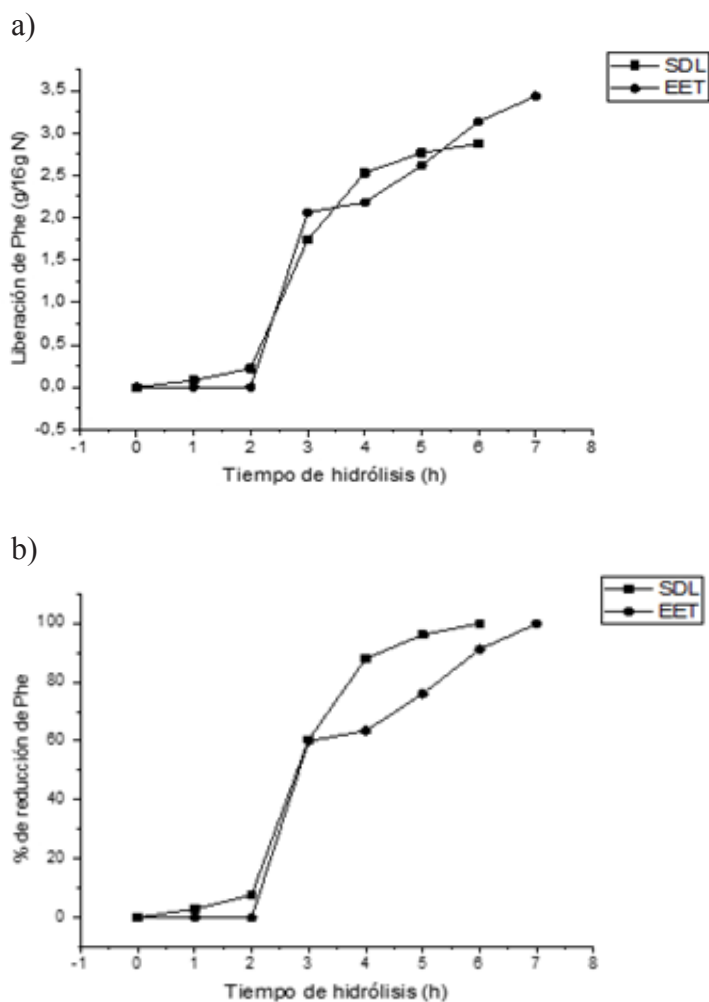
Contenido	Base húmeda (%)	Base seca (%)
Humedad	7,31 ± 0,29	0,00
Proteína cruda	88,99 ± 0,63	96,01

de porcino; b) 5 horas con proteasa bacteriana de *S. griseus*.

Los resultados se muestran en las Figura 1 (a) y (b). El tratamiento de 2 horas con la pepsina no tiene efecto relevante en la ruptura de las proteínas o generación de péptidos, ya que no se observa un incremento significativo en la cantidad de *Phe* detectada. Sin embargo, con la proteasa de *S. griseus* luego de 1 hora de tratamiento, se cuantificó más de 2 g de *Phe*/16 g de nitrógeno, respectivamente, debido a que esta no tiene punto específico de acción.

La liberación de la *Phe* ocurre más rápido en el suero de leche que en el aislado proteico de chachafruto, es así que en este último la separación total de la *Phe* ocurre una hora más tarde, asumiendo que esto puede ser debido a la matriz proteica de cada alimento. Es importante recalcar que el nivel de *Phe* de los hidrolizados filtrados a través de columnas de carbón activado no presenta cantidad detectable de *Phe* según los métodos de fluorometría y HPLC, por lo tanto, se supone la reducción del contenido del aminoácido a valores no identificables.

*Perfil de aminoácidos de suero de leche en polvo, aislado proteico de chachafruto y los respectivos hidrolizados.* En la Figura 2 se observa la diferencia entre el contenido de aminoácidos antes y después del tratamiento de hidrólisis para el suero dulce de leche, observándose que la *Phe* fue removida en su totalidad, mientras que la alanina un 85,88%, seguido de la isoleucina (65,40%), lisina (60,32%), prolina (59,07%), tirosina (54,69%), y en el resto de aminoácidos se perdió menos del 50%. Cabe mencionar que en



**Figura 1.** Cuantificación de la liberación (a) y la reducción (b) de la *Phe* en el suero dulce de leche (SDL) y harina de Chachafruto (EET) en las 7 h de hidrólisis enzimática.

la mayoría las concentraciones de los aminoácidos entre el suero dulce y su hidrolizado hay diferencias significativas.

En la Figura 3 se observa la diferencia entre el contenido de aminoácidos de la chachafruto antes y después del tratamiento de hidrólisis, observándose que la *Phe*, *lisina* y *leucina* fueron removidas hasta valores no detectables, mientras que la mayoría fue removida sobre el 50 % de la cantidad inicial. Además, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de aminoácidos antes y después del hidrolizado de las proteínas del chachafruto en lo que corresponde a histidina, arginina, metionina y cisteína.

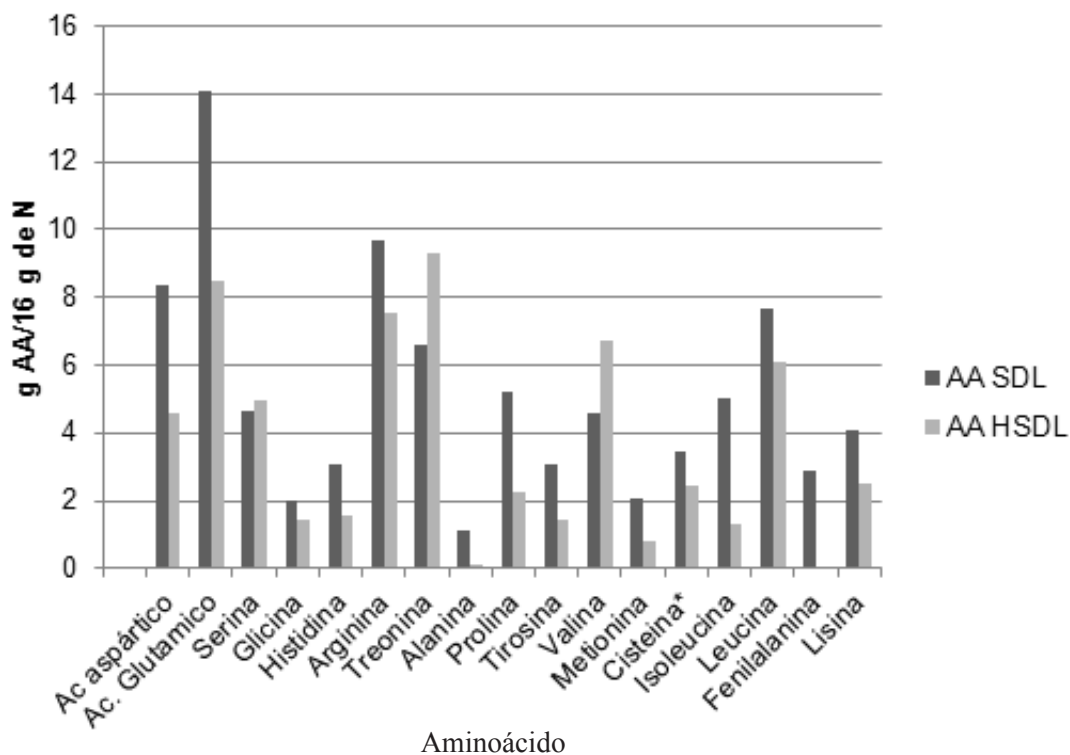


Figura 2. Perfil de aminoácidos (AA) del suero dulce de leche antes y después de la hidrólisis. AA SDL, Contenido de aminoácidos del suero antes de la hidrólisis; AA HSDL. Contenido de aminoácidos del suero después de la hidrólisis y con el tratamiento de carbón activado.

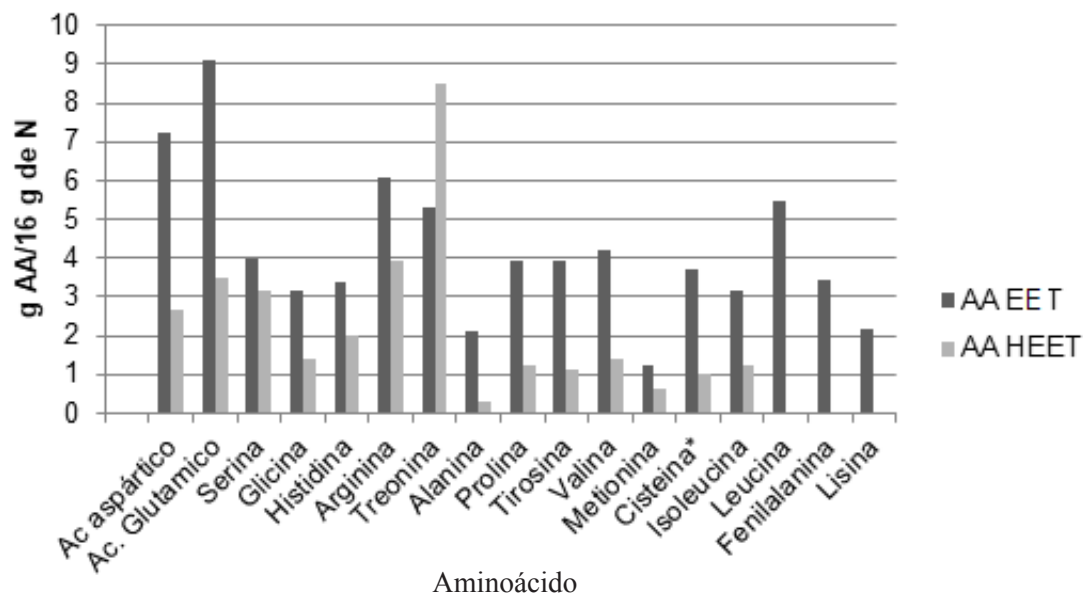


Figura 3. Perfil de aminoácidos de la harina de chachafruto antes y después de la hidrólisis. AA EET, Contenido de aminoácidos de chachafruto antes de la hidrólisis; AA HEET. Contenido de aminoácidos de chachafruto después de la hidrólisis y con el tratamiento de carbón activado

## Discusión

*Caracterización química del suero de leche en polvo.* En la Tabla 1, se presentaron los resultados obtenidos de la composición proximal del suero dulce de leche y los reportados por Arcila and Mendoza (15), de los cual, al comparar estos datos en base seca se observa que son similares. De acuerdo a lo establecido en la norma del CODEX(16) para suero en polvo (stand 289-1995), este debe tener un contenido de agua máximo de 5 % y de cenizas un 9,5%, mientras que a su vez establece que el contenido de proteína láctea debe ser como mínimo un 10%, cumpliendo el producto con lo establecido.

*Preparación y caracterización de la harina de harina de chachafruto.* En la Tabla 2 se reportó la composición proximal de la harina de chachafruto, donde se observa un contenido de 26,19% de proteína en base seca, valor que difiere del reportado por (17). Estos autores reportaron valores entre 18 a 21% de proteína. Mientras, que los valores de 20,5 % de proteína, 0,5% de grasa, 5,64% de cenizas y 73,33% de carbohidratos son reportados por (18). Estas diferencias, respecto a los valores obtenidos se pueden atribuir a muchos factores como son el método de extracción empleado, las condiciones ambientales-geográficas y agrarias del cultivo.

*Obtención del aislado proteico de harina de chachafruto por precipitación del punto isoeléctrico.* En la Tabla 3 se presentó el valor al que se llevó la proteína, contenido para que el producto sea considerado aislado proteico debe poseer más del 90% de proteínas(19). Estudios similares con pequeñas variaciones fueron realizados en la obtención de los concentrados. Esta extracción fue realizada a pH 12 de las proteínas solubles seguido de una precipitación ácida (pH 5) en el punto isoeléctrico, obteniéndose una concentración de proteína hasta un 86% (20).

*Reducción y cuantificación del nivel de Phe de las proteínas hidrolizadas del suero y aislado proteico de chachafruto* La Figura 1 (a) muestra la liberación de Phe y la Figura 1 (b) la cantidad de Phe removida

tanto del suero como del aislado proteico de chachafruto, además se observa que el tratamiento de 2 horas con la pepsina no tiene efecto relevante en la liberación de Phe. Sin embargo, éstas tiene efecto sobre la formación de péptidos ya que hidrolizan únicamente enlaces peptídicos y exhiben preferencia por los enlaces hidrofóbicos, específicamente son favorecidos los residuos aromáticos, así como aquellos residuos azufrados, y preferentemente escinde el C-terminal de fenilalanina, leucina y en menor medida ácido glutámico (21). La pepsina no escinde enlaces que involucran valina, alanina o glicina (22).

La proteasa utilizada proveniente del microorganismo *S. griseus* produjo una hidrólisis relativamente importante dentro del concentrado proteico, lo cual se observa por el aumento de Phe dentro de la muestra, al aumentar el tiempo de hidrólisis. Efecto similar fue observado en los trabajos de (12, 23, 24) al utilizar esta enzima en un producto alimenticio y en leche, respectivamente.

La liberación de la Phe ocurre más rápido en el suero de leche que en el aislado proteico de chachafruto, es así que en este último la separación total de la Phe ocurre una hora más tarde, asumiendo que esto puede ser debido a la matriz proteica de cada alimento. Es importante recalcar que el nivel de Phe de los hidrolizados filtrados a través de columnas de carbón activado no presenta cantidad detectable de Phe según los métodos de fluorometría y HPLC, por lo tanto, se supone la reducción significativa del contenido del aminoácido.

No se encontró reportes en la literatura respecto a la reducción de Phe de los hidrolizados de harina de chachafruto, pero sí de otros productos. Por ejemplo en hidrolizados de caseína se logró una disminución de Phe del 92% (24). Esta discrepancia puede estar relacionada con la mayor cantidad de carbón activado o número de filtraciones del mismo. En *Phaseolus vulgaris* se logró remover la Phe en un 94,49% (23) y en concentrado proteico de amaranto se determinó la eficiencia de la remoción de Phe, midiendo el contenido de Phe después del tratamiento con carbón activado de lo cual obtuvo un 98,78% para el tratamiento con proteasa *S. griseus* y 96,16% con *A. orizae*, ambas a 37 °C y durante 3 horas de reacción(4).

*Perfil de aminoácidos de suero de leche en polvo, aislado proteico de chachafruto y los respectivos hidrolizados.* En la

Figura 2 se observa el cambio en el contenido de aminoácidos del suero antes y después de la hidrólisis, además de indicar que la *Phe* fue removida hasta valores no detectables.

En este sentido, en los estudios realizados en la producción a escala piloto de sustancias péptidas con bajo contenido en *Phe* para pacientes con fenilcetonuria, lograron reducir el contenido de *Phe* de 40 a 0,4% una vez hidrolizando las proteínas del suero y con la utilización de carbón activado. El efecto de la utilización del carbón activado incide también sobre la concentración de los otros aminoácidos, por ejemplo: la tirosina y triptófano que se redujeron drásticamente; el ácido aspártico, treonina, prolina, valina, metionina, lisina, histidina y arginina se incrementaron levemente, mientras que la serina, ácido glutámico, glicina y alanina se vieron ligeramente disminuidos (12).

Otro estudio sobre la optimización de la extracción de hidrolizados de la proteína del arroz por medio de la acción de la enzima *corolase* PP y carbón activado, encontraron que el contenido final de fenilalanina en los hidrolizados osciló de 0,39 a 68,34 mg/100 g, correspondiendo a los niveles de remoción de 84 a 100% haciendo posible su uso en la preparación de las formulaciones para *PKU* (25). Otro resultado similar es el caso de la hidrólisis de suero donde obtuvieron una reducción significativa del contenido de fenilalanina (97,3%) y de la tirosina (63%) y se vieron afectados moderadamente la valina, lisina, glicina y leucina (26).

La Figura 3 muestra el cambio en el contenido de aminoácidos del chachafruto antes y después de la hidrólisis una vez removido la *Phe* con carbón activado. Un estudio de la determinación del perfil aminoacídico de péptidos de amaranto, luego del tratamiento con carbón activado indica la ausencia de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina e isoleucina, mientras que prevalecen la histidina, arginina, cisteína, glicina (4). Es importante destacar que al comparar el perfil de aminoácidos del amaranto sin tratamiento y con tratamiento de carbón activado, determinaron una reducción sustancial en el contenido de aminoácidos aromáticos (4).

De acuerdo a los estudios mencionados anteriormente y en comparación con esta investigación, se define que la hidrólisis es un proceso que permite separar la *Phe* de las proteínas mediante el uso de enzimas, sin embargo, la acción de remoción mediante el uso de carbón activado no es

específico para la *Phe* ya que, en todos los estudios incluido este, la cantidad de los otros aminoácidos también se ve afectado tanto en los hidrolizados del suero como del aislado proteico de chachafruto.

Al comparar las concentraciones de los *Phe* del suero dulce de leche obtenidos por fluorometría y HPLC, se determinó que no existe diferencia significativa entre los métodos aplicados, sin embargo, por la rapidez y facilidad se recomienda el método de fluorometría, que presenta el inconveniente que solo esta estandarizado para *Phe*, y según (27) el método de fluorometría es más sensible que el de HPLC.

### Conclusiones

Se obtuvieron hidrolizados proteicos con bajo contenido de fenilalanina a partir del suero dulce de leche en polvo y harina de *E. edulis* Triana, mediante un proceso de hidrolisis enzimática y filtración con carbón activado para pacientes con fenilcetonuria.

Los valores obtenidos de la composición del suero de leche se encuentran dentro de los límites establecidos por la norma CODEX. Mientras que para la harina de *E. edulis* Triana se obtuvo la composición proximal. El rendimiento del proceso de obtención de la harina fue bajo debido a su alto contenido de humedad. Para ambos casos los valores de fenilalanina fueron reducidos a niveles no detectables tanto por fluorometría como por HPLC.

### Referencias

1. Baró L, Jiménez J, Martínez-Férez A, Bouza JJ. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Ars Pharmaceutica* 2017;42(3-4):135-45.
2. Guillén-López S, Vela-Amieva M. Actualidades en el tratamiento nutricional de la fenilcetonuria. *Act Pediatr México* 2011;32(2):107-14.
3. Mahfoud A, De Lucca M, Domínguez CL, Arias I, Casique L, Araujo K, *et al.* Hallazgos clínicos y espectro mutacional en pacientes venezolanos con diagnóstico tardío de fenilcetonuria. *Rev Neurología* 2008;47(1):5-10.



4. Pérez L. Elaboración de pastas con bajo contenido de fenilalanina, a base de harina de arroz (*Oriza sativa*) e hidrolizado proteico de amaranto *Amaranthus dubius* [Tesis doctoral]. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela; 2011.
5. Arango Bedoya O, Bolaños Patiño V, Ricaurte García D, Caicedo M, Guerrero Y. Obtención de un extracto proteico a partir de harina de chachafruto (*Erythrina edulis*). Rev Universidad y Salud 2012;14(2):161-7.
6. Biocomercio Sostenible. Estudio de mercado a nivel nacional de productos derivados del *Erythrina edulis* Triana. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt; 2003.
7. COVENIN. Productos de Cereales y leguminosas. Determinación de humedad (Norma COVENIN 1553-1980). Determinación de cenizas (Norma COVENIN 1783-1981). Determinación de grasa (Norma COVENIN 1785-1981), 1981.
8. COVENIN. Leche y sus derivados. Determinación de cenizas. 2da Revisión (Norma COVENIN 368-1997). Determinación de proteínas. 2da Revisión (Norma COVENIN 370-1997). Determinación de humedad. 2da Revisión (Norma COVENIN 1077-1997), 1997.
9. Pérez Sira EE, Lares Amaiz M, González Z, Tovar J. Production and characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) flours using different thermal Treatments. Interciencia 2007;32(9):615-9.
10. COVENIN. Alimentos. Determinación de nitrógeno. Método de Kjeldahl. (Norma COVENIN 1195-1980), 1980.
11. Adebawale KO, Lawal OS. Foaming, gelation and electrophoretic characteristics of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrates. Food Chemistry. 2003;83(2):237-46.
12. Arai S, Maeda A, Matsumura M, Hirao N, Watanabe M. Enlarged-scale production of a low-phenylalanine peptide substance as a foodstuff for patients with phenylketonuria. Agric Biol Chem 1986;50(11):2929-31.
13. Centro de Inmunoensayo. UMTEST PKU – Prueba fluorescente para la cuantificación de *Phe* en sangre seca sobre papel de filtro. La Habana, Cuba: Centro de inmunoensayo; 2008. p. 12.
14. Waters Associates. Product Bulletin No. L21 (Part No. 82523. 1984.
15. Arcila N, Mendoza Y. Elaboración de una bebida instantánea a base de semillas de amaranto *Amaranthus cruentus* y su uso potencial en la alimentación humana. Rev Fac Agronomía (LUZ) 2006;23(1):110-9.
16. Norma del Codex para sueros en polvo, CODEX STAN 289-1995, (1995).
17. Pérez G, Martínez C, Díaz E. Evaluation of the protein quality of *Erythrina edulis* (balúu). Arch Latinoamer Nutr 1979;29(2):193-207.
18. Barrera N, Mejía M. Chachafruto, balú, sachaporoto; *Erythrina edulis*, Triana. Pasado, presente y futuro. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 1997.
19. CODEX. Norma del Codex para productos proteínicos de soja, (CODEX STAN 175-1989), 1989.
20. Gonçalves N, Vioque J, Clemente A, Sánchez-Vioque R, Bautista J, Millán F. Obtención y caracterización de aislados proteicos de colza. Grasas y Aceites. 1997;48:282-9.
21. Knowles JR, Sharp H, Greenwell P. The pH-dependence of the binding of competitive inhibitors to pepsin. Biochem J 1969;113(2):343-51.
22. Rajagopalan TG, Moore S, Stein WH. Pepsin from pepsinogen preparation and properties. J Biol Chem 1966;241(21):4940-50.
23. Rengel A. Elaboración de un alimento a base de harina de arroz (*Oryza sativa*), plátano (*Musa aab*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) con bajo contenido de fenilalanina para consumo infantil [Tesis doctoral]. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela; 2010.
24. Soares RDL, Biasutti EAR, Capobianco M, Vieira CR, Silva VDM, Morais HA, et al. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. Acta farm bonaer 2007;25(3):325-332.
25. Bizzotto CS, Capobianco M, Biasutti EAR, Silva VDM, Junqueira RG, Silvestre MPC. Rice protein hydrolysates with low phenylalanine content, prepared by the action of corolase PP and the use of activated carbon. Ciênc Agrotec 2006;30(2):308-16.
26. Cueto D. Formulación de mezclas para torta y panqueca a base de harina yuca enriquecida para dietas con regímenes especiales [Tesis doctoral]. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela; 2010.
27. Pérez E, Pérez L, Requena L, Manhfoúd A, Domínguez CL, Rengel A, et al. Preparation of low-phenylalanine macro peptides and estimation of its phenylalanine content by fluorometric technique. J Nutr Ther 2013;2(3):137-44.

Recibido: 29/11/2018  
Aceptado: 27/03/2019