

FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA DE UNA BEBIDA FUNCIONAL

C. Aguilar-Bravo^a, M.C. del Rincón-Castro^{a,b}, M. F. León-Galván^{a,b*}

^a Posgrado en Biociencias, ^b Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. *fabiola@ugto.mx

RESUMEN:

El aumento del precio de la proteína animal redirige a un alto índice de desnutrición en las personas de bajos recursos económicos. Con el propósito de tener alternativas que logren incrementar los valores nutricionales de la dieta diaria, surge la necesidad de buscar fuentes alternas de proteínas que permitan la formulación del alimento con alto valor biológico y a bajo costo. La obtención de proteínas provenientes de fuentes vegetales se presentan como una excelente alternativa, debido a que son materias primas que pueden obtenerse de manera más fácil, con bajo costo y que pueden presentar diversas propiedades fisiológicas sobre el organismo humano. El objetivo de este estudio fue formular una bebida funcional (atole) a base de avena, ajonjolí, nuez y aislado proteico de soya para comprobar posteriormente la presencia de péptidos resistentes a 95°C en la bebida funcional como producto terminado. Así mismo, se evaluó la resistencia de los péptidos al proceso digestivo *in vitro* y se caracterizó proteomicamente. Los resultados indican que el atole tiene un contenido de proteína de 24% con una calidad del 100%, la caracterización proteómica indicó que están presentes péptidos que resisten la digestión *in vitro* así como también tratamiento térmico a 95°C hasta por al menos 15 minutos.

ABSTRACT:

The rising price of animal protein redirected to a high rate of malnutrition in low-income persons. In order to have alternatives for them to increase the nutritional value of the diet, the need to seek alternative sources of proteins that allow the formulation of food with high biological value and low cost. Obtaining proteins from plant sources is becoming increasingly important, because they are raw materials that can be obtained more easily, with low cost and can have various physiological properties on the human body. The objective of this study was to develop a functional drink (gruel) based on oats, sesame, walnut and soy protein isolate to subsequently check the presence of peptides resistant to temperatures above 95°C functional finished beverage product. Likewise, the resistance of the digestive process peptides was assessed *in vitro* and characterized proteomicamente. The results indicate that the quality gruel has gruel has a protein content of 24% with a protein quality of 100% proteomics characterization indicates peptides resist digestion *in vitro*, as well as heat treatment at 95°C for at least 15 minutes.

Palabras clave: Bebida, PDCAAS, Proteína.

Keywords: Drink, PDCAAS, Protein.

Área: Alimentos Funcionales

INTRODUCCIÓN

Un alimento funcional es aquel que por sus características nutricionales puede cumplir una función específica como mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades, como alimento debe contener de forma natural o adicionada componentes biológicamente activos, en ese sentido las proteínas juegan un papel fundamental sobre todo en el aporte de péptidos bioactivos. Actualmente, existe en el interés de por desarrollar tecnologías que mantengan la actividad biológica de estos componentes después del procesamiento.

Un concepto importante en nutrición proteica es la calidad de la proteína, principalmente, determinada por el perfil y proporción de los aminoácidos que la componen. Para evaluar la calidad de la proteína existen diversos métodos, actualmente se utiliza el cómputo de aminoácidos corregido por la digestibilidad de la proteína (PDCAAS). La complementación proteica permite, mediante la formulación de mezclas de proteínas de baja calidad, mejorar la biodisponibilidad, y por tanto la calidad de esta mezcla proteica. La importancia de la proteína presente en la dieta se debe a su capacidad de aportar aminoácidos para atender el mantenimiento de la proteína corporal y al incremento de esta durante el crecimiento (Martínez y Martínez, 2006; Suárez *et al.*, 2006).

Las proteínas alimentarias se clasifican como completas o incompletas según su contenido de aminoácidos. Las proteínas completas alimentarias tienen los nueve aminoácidos indispensables en concentraciones suficientes para cubrir los requerimientos de los seres humanos. Las proteínas incompletas alimentarias son deficientes en uno a más aminoácidos de los nueve aminoácidos esenciales que deben ser proporcionados por los alimentos; Asociado a esto, el término calidad proteica se refiere a la capacidad de una proteína de la dieta para incorporarse en las proteínas corporales y se puede estimar a través de varios indicadores, dentro de los que se destaca el valor biológico o calificación química (González *et al.*, 2007).

En este trabajo se planteó como objetivo caracterizar protómicamente la bebida funcional tipo “atole” que lleva como fuentes proteicas vegetales nuez, avena, ajonjolí y aislado proteico de soya. Se seleccionaron estos ingredientes en función de sus propiedades nutrimentales, la nuez es rica en ácidos grasos insaturados como el oleico, linoleico y se ha clasificado en el grupo de alimentos con alto valor proteico; por su parte la avena se ha asociado a la disminución de los niveles del colesterol de baja densidad, mientras que el ajonjolí presenta una excelente fuente de antioxidantes, y el aislado de proteína de soya es comúnmente usado para elevar el contenido de proteína. En conjunto los ingredientes aportan todos los aminoácidos esenciales que se busca en un alimento funcional.

La bebida formulada presentó un score químico de 1.19 y un PDCAAS de 1.0, lo que representa una fuente de proteína completa para adultos por tener todos los aminoácidos esenciales en niveles apropiados para la síntesis de proteínas en el organismo. El análisis químico proximal indicó que la bebida contiene 24.17 g de proteína en 100g de alimento. En cuanto a su caracterización proteómica se

observaron peptidos resistentes a temperaturas de 95°C por al menos 15 minutos y la resistencia de peptidos a la digestión *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Material biológico

Nuez, avena y ajonjolí proporcionadas por el Dr. José Luis Anaya, del INIFAP, Campo experimental Bajío y aislado proteico de soya marca Cuadritos Biotek.

Formulación de la bebida funcional

Se realizó de acuerdo con los lineamientos propuestos por la FDA, FAO y la OMS. Se empleó el método del score químico y el método del Puntaje Químico Corregido por la Digestibilidad Verdadera (PDCAAS) empleando el patrón de referencia de la FAO, 1985 para adultos.

Extracción de proteína total de harina de atole

Se realizó por el método de Ácido Tricloro Acético con β -mercaptoetanol (TCA-C) de acuerdo con el protocolo establecido por Savaran & Rose (2004), en donde la mezcla se sonicó con un sonicador (GE-505, Ultrasonic Procesor) para centrifugarse posteriormente y obtener una pastilla que se resuspendió en una solución de rehidratación (UREA 8M y CHAPS 2% con 50 mM de DTT) para su posterior cuantificación y análisis electroforético.

Cuantificación de proteína total

Se llevo a cabo por el método de Bradford con el kit Protein assay de Biorad en el espectrofotómetro lambda XLS de acuerdo con las especificaciones del fabricante y al protocolo modificado (Comunicación personal; León, 2013).

Electroforesis SDS-PAGE

Se realizó de acuerdo con el método reportado por Huerta-Ocampo (2011). Los geles se corrieron en un sistema Tetra Mini-Protean de Biorad. La reducción de puentes disulfuro se realizó con β -mercaptoetanol. Se emplearon geles de poli(acrilamida) al 12.5% y de un tamaño de 0.75 mm, en condiciones desnaturalizantes.

Electroforesis bidimensional (2D)

Se emplearon tiras de IPG de 7cm de un rango de pH de 3-10, se rehidrato la tira por 16h y el isoelectoenfoque se llevó a cabo en el equipo Protean de Biorad; se elaboraron geles de poli(acrilamida) al 15% y al 18%.

Digestión in vitro

La hidrólisis enzimática se llevo a cabo con la enzima tripsina y posteriormente se realizó la caracterización bioquímica en geles de poli(acrilamida) SDS-PAGE y en geles 2D.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla I se presenta el puntaje químico y el puntaje químico del atole corregido por la digestibilidad verdadera. Se observa como aminoácido limitante de la mezcla

proteica a los aminoácidos azufrados (cistina metionina) con un escore químico de 1.19 que quiere decir que con este valor y debido a la complementación proteica el déficit de este aminoácido esencial en la mezcla queda cubierto. La asimilación de nutrientes es diferente en todos los seres humanos por lo que este valor se corrigió por la digestibilidad verdadera dando como resultado una calidad de proteína igual a 1.0 es decir del 100%.

Esto quiere decir que la proteína presente en la bebida funcional es una proteína completa por tener todos los aminoácidos esenciales en niveles apropiados para el organismo humano, en este caso para adultos. La digestibilidad verdadera del atole es comparable con otras proteínas de alta calidad como la leche, carne, huevo que van de 94 a 97%. La soya por si misma tiene un PDCAAS de 100%. La soya, el garbanzo, el pistacho y la remolacha son los únicos alimentos vegetales que no contienen aminoácidos limitantes (Suárez *et al.*, 2006; González, 2010).

Tabla I. Puntaje químico y Puntaje Químico Corregido por la Digestibilidad Verdadera (PDCAAS) del atole.

Datos analíticos								Cantidades en mezcla				
	Peso (g)	Proteína (g/100g)	Lisina	AAS	Treonina	Triptofano	Factor diges	Proteína (g)	Lisina	AAS	Treonina	Triptofano
	A	B	C	D	E	F	G	P= (A*B)/100	P*C	P*D	P*E	P*F
Soya		47	63.19	22.34	48.29	11.91	0.95	44.99	2842.9181	1005.0766	2172.5671	535.8309
Nuez		13.43	44.6	13.3	35.2	12.4	0.75	9.99	445.554	132.867	351.648	123.876
Avena		16.2	31.91	14.44	28.51	10.86	0.9	24.99	797.4309	360.8556	712.4649	271.3914
Ajonjolí		22.4	26.11	26.87	34.06	26.2	0.82	19.99	521.9389	537.1313	680.8594	523.738
TOTALES								99.96	4546.9	2035.9305	3917.5394	1454.8363
AMINOACIDO mg/g proteína (TOTAL PARA CADA AA/TOTAL DE PROTEÍNA)								45.4871949	20.367452	39.1910704	14.5541847	
PATRÓN DE REFERENCIA EN mg/g de proteína			ADULTOS					16	17	9	5	
SCORE DE LA MEZCLA DE AA/g DE PROTEÍNA DIVIDIDO POR EL PATRÓN DE REFERENCIA							ADULTOS	2.84294968	1.19808541	4.35456338	2.91083693	
PROMEDIO DE LA DIGESTIBILIDAD VERDADERA. SUMA DE (P*G)/PROTEÍNA TOTAL							0.85					
SCORE AJUSTADO * LA DIGESTIBILIDAD VERDADERA					ADULTOS	1.0183726	100% =1.0					

Los resultados correspondientes al análisis químico proximal se presentan en la tabla II, la proteína del atole se compara con los valores de proteína de lentejas (23%), proteínas de chíá (22.7%) y al del garbanzo (21%) (Contreras *et al.*, 2010).

Tabla II. Composición proximal de harina para preparar atole.

Componente	cantidad * (g/100g)
Humedad	5.7±0.43
Cenizas	3.11±0.19
Grasa	26±3.46
Proteína	24.17±3.46
Fibra cruda	7.63±3.78
Carbohidratos (por diferencia)	31.07

El perfil electroforético de la proteína total de harina de atole se muestra en la figura 1. En el carril E1 se observa claramente, la presencia de proteínas aun cuando el atole se sometio a una temperatura de 95°C. se observan proteínas de mayor concentración en pesos moleculares que va desde los 20kDa a los 40 kDa, estando presentes proteínas a bajas concentraciones, pero de pesos moleculares mas grandes.

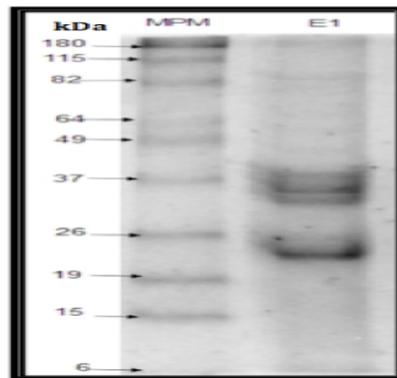


Figura 1. Perfil electroforético SDS-PAGE de proteína total del atole. El análisis se realizó en un gel de poliacrilamida al 12.5% en condiciones desnaturizantes teñido con azul de Coomassie. Carril MPM: marcador de peso molecular en kDa, carril E1: Proteína total del atole.

En la figura 2 se observa el perfil electroforético de digeridos trópticos a los 15 minutos por tetraplicado. Este perfil nos comprueba la digestión y en base a estos resultados, las soluciones de digeridos pertenecientes a estos patrones se mandaran a analizar para la identificación de péptidos. Se observan péptidos con pesos moleculares menores a 6kDa y barridos que indican la degradación de la proteína.

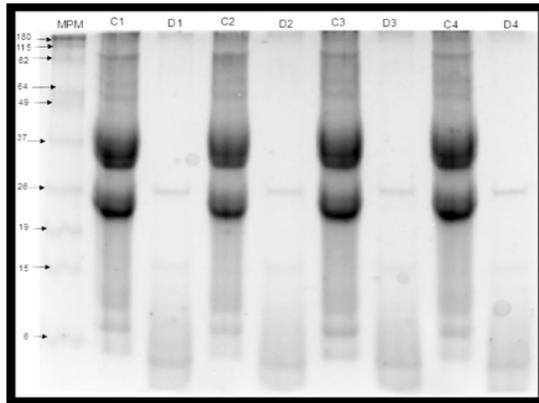


Figura 2. Perfil electroforético de la digestión con tripsina de proteínas total a los 15 minutos por tetraplicado. Carril MPM: marcador de peso molecular, Carril C1, C2, C3 y C4: controles, Carril D1, D2, D3 y D4: digeridos trípticos a los 15 minutos por tetraplicado.

En la figura 3 se observa el mapa proteómico de la hidrólisis enzimática, en este perfil bidimensional se observan spots distribuidos homogéneamente a lo largo del rango de pH de 3-10, especialmente, hay 3 spots que muestran mayor concentración y tienden a pH básico. De igual manera, se observa que hay spots con mismo peso molecular pero solo difiere en su punto isoeléctrico.

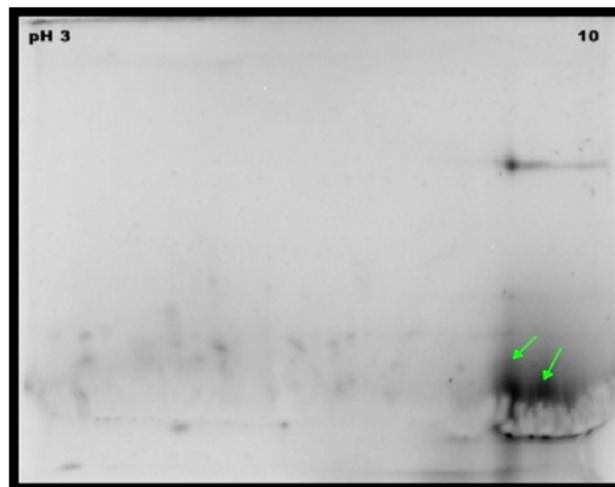


Figura 3. Mapa proteómico de digeridos trípticos de proteína total del atole. Gel de poliacrilamida al 18.5% usando tiras de EPG de 7cm de pH 3 a 10. Teñido con azul de comassie.

BIBLIOGRAFÍA

Contreras López Elizabeth, Jaime Ordaz Judith, Porrás Martínez Griselda, Juárez Santillán Luis Felipe, Añorve Morga Javier y Villanueva Rodríguez Socorro.

- (2010). Propiedades fisicoquímicas y sensoriales de harinas para preparar atole de amaranto. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. 6 No. 2.
- González Torres Laura, Téllez Valencia Alfredo, Sampedro José G., Nájera Hugo. 2007. Las proteínas en la nutrición. Revista de Salud Pública y Nutrición. Vol. 8 No.2
- González Bárcena Alejandra. 2010. La soya es una proteína completa. Revista Énfasis. Disponible en: <http://www.alimentacion.enfasis.com/articulos/15681-la-soya-es-una-proteina-completa>
- Martínez Augustino, Martínez de Victoria, E. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. 2006. *Nutr. Hosp.* vol.21, suppl.2, pp.01-14. ISSN 0212-1611.
- Suárez Lopez M. M.; Kizlansky A. y López L. B. 2006. Evaluación de la calidad de las proteínas en los alimentos calculando el score de aminoácidos corregidos por la digestibilidad verdadera. *Nutrición Hospitalaria.* 21(1):47-51.