

EVALUACIÓN DE LA TERMOESTABILIDAD DEL PERFIL PROTEÓMICO DE INGREDIENTES FUNCIONALES PARA LA ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA CON POTENCIAL ANTIHIPERTENSIVO

N.Z Ramirez-Rojas^a, E. Mares-Mares^a, G.A. López-Andrade^{b,c}, M.F. León-Galván^{a,b*}

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

RESUMEN:

La semilla del aguacate tiene una amplia riqueza polifenólica; estos compuestos tienen efectos antioxidantes, hipocolesterolémicos e hipoglucemiantes. Además el mucílago del nopal también reporta efectos hipoglucemiantes e hipocolesterolémicos. Por lo que, se formuló una bebida con estos extractos, se agregaron aditivos con la finalidad de impartir características sensoriales agradables. Esta diversidad de componentes, conlleva a la existencia de complejas interacciones entre ingredientes afectando la vida útil, características sensoriales y disponibilidad de los compuestos bioactivos, por lo que, el uso de soluciones modelo, por ser un sistema controlado, permitiría deducir algunas de las posibles interacciones en la bebida. El objetivo de este estudio fue observar el efecto de los edulcorantes en las interacciones fisicoquímicas entre polifenol-pectina. Las variables de estudio fueron: polifenol, pectina y edulcorante. Las variables de respuesta capacidad antirradical (% I), fenoles totales (mg/LEAG) y HPLC (ppm). Los resultados indicaron que existe una interacción polifenol-edulcorante, la adición de un edulcorantes a la solución polifenol-pectina, contribuyen al aumento o disminución de la concentración de polifenoles disponibles, este fenómeno también es observado en la bebida formulada.

ABSTRACT:

The seed of the avocado has a wide polyphenolic richness; these compounds have antioxidant, hypocholesteremic and hypoglycemic effects. Besides cactus mucilage also reported hypoglycemic and hypocholesterolemic effects. So a drink was formulated with these extracts, adding additives, in order to provide pleasant sensory characteristics. This variety of components, carry to the existence of complex interactions between ingredients affecting the shelf life, sensory characteristics and the availability of bioactive compounds, the use of model solutions, as a controlled system, allow deducing some of possible interactions in the beverage. The objective of this study was to observe the effect of sweeteners in the physicochemical interactions between the polyphenol-pectin. The variables studied were: polyphenol, pectin and sweetener. Response variables antiradical capacity (% I), total phenols (mg/LEAG) and HPLC (ppm). The results indicated that there is an interaction polyphenol sweetener, the addition of a sweeteners pectin-polyphenol solution, contributing to the increase or decrease of polyphenols available, this phenomenon is also observed in the formulated beverage.

Palabras clave: Antihipertensivo, termoestabilidad, alimento

Keywords: Antihypertensive, thermostability, food

Área: Alimentos Funcionales

INTRODUCCIÓN

Un alimento funcional es aquel que es elaborado no solo por sus características nutricionales sino también para cumplir una función específica como puede ser mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades. Para ello se le agregan componentes biológicamente activos, como minerales, vitaminas, etc. Las proteínas se han convertido actualmente en el principal foco de atención de la mayoría de los tecnólogos de alimentos en el mundo, ya que el ser humano debe completar sus necesidades biológicas (Badui, 2006). La búsqueda de fuentes alternativas de proteínas se ha convertido, a lo largo de las últimas décadas, en una importante tendencia de investigación, no solo para encarar la creciente demanda de proteínas sino también para conseguir cultivos alternativos que sustituyan a las proteínas de origen animal, capaces de suplementar proteína de alta calidad y prevenir la malnutrición.

Las proteínas de semillas en general, gozan de aceptación mundial y son valoradas por sus atributos sensoriales y nutricionales (Padilla *et al.*, 2010). Los frutos secos destacan por su elevado contenido energético, ya que, por término medio, 100 g aportan 560 kcal. Este importante valor energético deriva de su escaso contenido en agua y, sobre todo, de su notable cantidad de grasas: en la mayoría de los frutos secos, más del 50% de su peso son grasas. Predominan los ácidos grasos insaturados, entre ellos, el ácido linolénico y oleico, nutrientes esenciales para el ser humano. También destacan por su alto contenido en proteínas, de relativo valor biológico y que adecuadamente combinadas con cereales y legumbres, dan lugar a proteínas completas equivalentes a las de origen animal. Por el contrario, son pobres en hidratos de carbono, ya que, en la mayoría de los frutos secos, su contenido ronda el 10% o es inferior. Por último, constituyen una excelente fuente de algunas vitaminas (especialmente E y del grupo B) y minerales, y son ricos en fibra.

Las proteínas de origen animal, se caracterizan por su calidad proteica ya que contienen todos los aminoácidos esenciales. Alimentos como el huevo, la carne y la leche y sus derivados como el suero de leche son un claro ejemplo. Las proteínas del suero de leche no sólo juegan un importante papel nutritivo como una rica y balanceada fuente de aminoácidos, sino que, además, en muchos casos, parecen ejercer determinados efectos biológicos y fisiológicos *in vivo* (Hernández-Ledezma y Chia-Chien 2013). La formulación de alimentos con propiedades funcionales y que exista la biodisponibilidad resultara una estrategia para el tratamiento y prevención de enfermedades como la hipertensión. Cuando en los alimentos se han encontrado biomoléculas funcionales, la integridad o estabilidad de las mismas definirá la funcionalidad de los mismos. En el ejercicio para asegurar la inocuidad y calidad alimentaria al consumidor, estas biomoléculas se ven afectadas debido al uso de tratamientos térmicos severos y la funcionalidad y/o el potencial biológico se ve afectado significativamente. Por tal motivo este trabajo de investigación se enfocó en evaluar la estabilidad del perfil proteómico de la nuez y el lactosuero sometidos a diferentes tratamientos térmicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Suero de leche de vaca. Se utilizó leche de vaca, para la obtención de suero de leche a partir de queso fresco. Para la obtención de lactosuero será de acuerdo a lo establecido por ASELAC (2014).

Nuez (*Carya illinoensis*). Las muestras de semilla de nuez de variedad Wichita, fueron sometidas a diferentes rangos de temperatura: 70°C, 95°C y a 120±5°C a diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas). Posteriormente fueron molidas y desgrasadas por el método Soxhlet según lo reportado por el AOAC (1990).

Semilla de Chicayota (*Cucurbita argirosperma sororia*). Las semillas de chicayota se sometieron a tratamientos térmicos de vapor durante 20, 30 y 40 minutos. Las semillas tratadas térmicamente fueron molidas con agua purificada en una relación 1:10 (g de semilla/mL de agua) y el extracto acuoso se filtró para la obtención de una leche vegetal (Badui, 200)

Extracción de proteína de origen animal. Se utilizó el protocolo de precipitación y limpieza de proteínas con metanol-cloroformo de acuerdo a Novoa y Sánchez (2011) para las proteínas del suero de leche.

Extracción de proteína vegetal total. Se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Saravan y Rose (2004). Se utilizó el método TCA-C (acetona fría con 10% de TCA y 0.07% de β -mercaptoetanol) a fin de obtener el mayor contenido y caracterización molecular óptima de la proteína total sin presencia de contaminantes que interfieren en el isoelectroenfoque y la resolución de la electroforesis bidimensional.

Cuantificación de proteína (Bradford). La proteína total de los ingredientes funcionales se cuantifico utilizando el método de Bradford con el kit Protein Assay de Bio-Rad de acuerdo con las especificaciones del fabricante y al protocolo modificado por León Galván.

Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE). La electroforesis de proteínas e hidrolizados proteicos en Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) se realizará de acuerdo con el método reportado por Laemmli (1970).

Electroforesis en Doble Dimensión 2D. La primera dimensión (Isoelectroenfoque) se utilizó tiras de gradiente inmovilizado de pH 3-10 de 7 cm de largo (ReadyStrip™ IPG Strips), la tira se sumergió en una muestra de proteína. Una vez que la proteína alcanzo su punto isoelectroenfoque se prosiguió con la segunda dimensión realizada en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de proteína

Los resultados de la cuantificación de proteína total de los ingredientes funcionales, indican que la proteína puede resistir altas temperaturas que van desde los 70°C hasta 120°C pero solo hasta por 12 horas, posterior a ese tiempo se observa un incremento en la concentración de proteína, sin embargo, al ser la misma cantidad inicial de proteína, lo que se concluye es que la proteína empieza hidrolizarse.

Al realizar el análisis de acuerdo al ANDEVA al 95% de confiabilidad y utilizando un diseño factorial, la temperatura y el tiempo resultaron significativos de forma independiente y en interacción.

Tabla I.- Proteína total sometida a tratamiento térmico de 70°C a diferentes tiempos		
70°C		
12 horas	24 horas	48 horas
4386 ug/g	4196 ug/g	4795 ug/g

Tabla II.- Proteína total sometida a tratamiento térmico de 95°C a diferentes tiempos		
95°C		
12 horas	24 horas	48 horas
4727 ug/g	5033 ug/g	4658 ug/g

Tabla III.- Proteína total sometida a tratamiento térmico de 120°C a diferentes tiempos		
120°C		
12 horas	24 horas	48 horas
4418 ug/g	3858 ug/g	2366 ug/g

Con relación al análisis de proteína en análisis en geles SDS-PAGE, se observó que el patrón de bandas disminuye con respecto a la temperatura y el tiempo al que se somete la nuez en los diferentes tratamientos térmicos, lo anterior puede analizarse en la fig. 1 Carril 1: 23 bandas (220-menos de 10 kDa) carril 2: 18 bandas (220-10kDa) carril 3: 16 bandas (220-10kDa) carril4: 18 bandas(220-10kDa) carril5: 16 bandas (220-10kDa) carril 6: 18 (220-10kDa) carril 7: 17 bandas (220-10kDa) carril 8:12 bandas (220-10 kDa) carril 9: 8 bandas (220-10kDa). Del carril 1-7 la proteína con un peso molecular de 80-50kDa, 35-25kDa y 15-10 kDa se mantienen. Para la proteína de lacto suero, este gel todas las bandas se mantiene lo único que cambia es la intensidad de las bandas (Fig. 2).

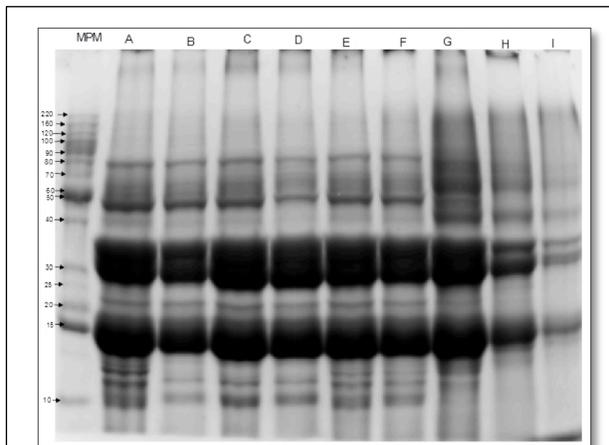


Figura 1. Proteína total de nuez sometida a los diferentes tratamientos térmicos. Carril A: 70°C-12h, Carril B: 70°C-24h, Carril C: 70°C-48h, Carril D: 95°C-12h, Carril E: 95°C-24h, Carril F: 95°C-48h, Carril G: 120°C-12h, Carril H: 120°C-24h, Carril I: 120°C-48h.

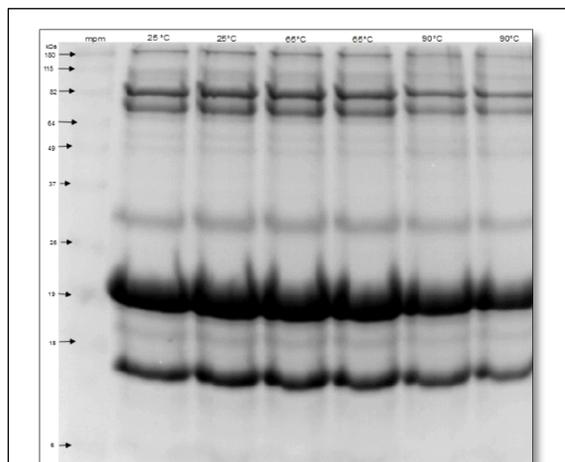


Figura 2. Proteína total lactosuero sometido a pasteurización rápida y lenta en geles SDS-PAGE. Carril 1 y 2: 25°C, Carril 3 y 4: 65°C por 30 minutos, Carril 5 y 6: 90°C por 10 minutos.

Finalmente, el análisis bidimensional de las proteínas indicó y confirmó lo que se ha obtenido en las etapas anteriores de este trabajo, que las proteínas pueden resistir hasta 70°C, pero a nivel puntual si presenta pérdida con respecto al incremento de la temperatura, por ejemplo, como puede observarse en las fig 3. para la proteína sometida a 70°C/12h se detectan puntos de peso molecular de 40 kDa: 5 spot, 35 kDa: 1 spot, 30-25kDa: 16 spot, 20-10: 20 spot; Para el tratamiento a 95°C/12h (fig.4) se observan a 40 kDa: 3 spot, 30-25kDa: 12 spot, 20-10kDa: 12; y para el tratamiento a 120°C/12h (fig. 5) a 40kDa: 1spot difuminado, 25-30 kDa: 8 spot difuminados, 20-10 kDa: 10 difuminados.

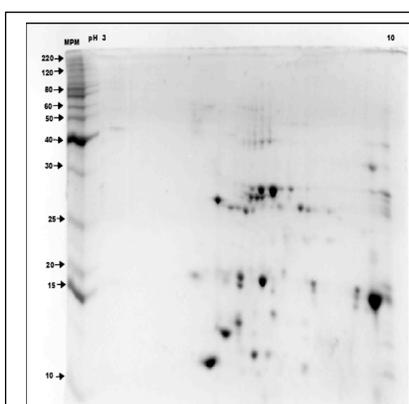


Figura 3.- Gel en doble dimensión de proteína total sometida a tratamiento térmico 70°C-12h.

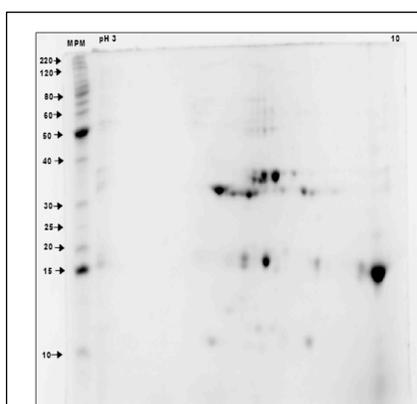


Figura 4.- Gel en doble dimensión de proteína total sometida a tratamiento térmico 95°C-12h.

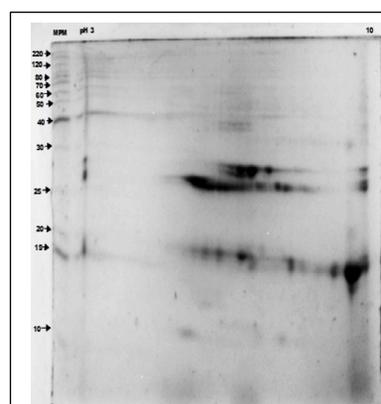


Figura 5.- Gel en doble dimensión de proteína total sometida a tratamiento térmico de 120°C-12h.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis Association of Analytical Chemists. 15TH ed. William Horwits. Washington D.C USA.
- ASELAC. 2014. Apuntes del curso de Asesoría Láctea (ASELAC). Curso Basico de productos lácteos. Texcoco Edo. México. Disponible en: <http://www.asesorialactea.com.mx/24901/83022.html>
- Badui, D. S. 2006. Química de los alimentos. Pearson Educación: México: 205-632.
- Hernández, B. y Chia, H. 2013. Bioactive Food Peptides in Health and Disease, Edited by Blanca p. cm. ISBN 978-953-51-0964-8
- Novoa, S. S. y Sánchez, M. 2011. Obtención de un sub proteoma de citoplasma de una línea celular de trofoblasto mediante fraccionamiento con detergentes. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 35(136), 277-285.
- Padilla Fanny, Guédez Thane, J Alfaro María, Regnault Miriam, M Rincón C Alicia., Junio 2010. "Fraccionamiento y caracterización de las proteínas solubles de la harina de nuez". Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel.
- Saravanan, R. & Rose, J. 2004. A critical evaluation of simple extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues.
- Laemmli U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Descripción del método SDS-PAGE. Páginas: 680-685.