

Composición químico-proximal de una bebida funcional con potencial antidiabético formulada con semilla de chicayota (*Cucurbita argyrosperma* subsp. *sororia*) y suero de leche

F. L. M. Herrera-Castillo¹, D. A. Montenegro-Arredondo², S. Gutiérrez-Vargas¹, E. Mares-Mares¹ y M. F. León-Galván^{1*}

Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida del Campus Irapuato-Salamanca **1** Posgrado en Biociencias, **2** Departamento de Alimentos. Carretera Irapuato Silao Km 9. Col. Ex Hacienda el Copal. Cp. 36000. Irapuato, Guanajuato.

*fabiola@ugto.mx

RESUMEN:

La diabetes es una enfermedad crónica que contribuye a la mortalidad general en nuestro país. El uso de medicamentos para el tratamiento de la diabetes está asociado con efectos secundarios indeseables, por lo que se han comenzado a estudiar componentes activos de alimentos para la prevención y/o el manejo de esta enfermedad. El objetivo del trabajo fue formular una bebida funcional y determinar su composición química proximal, a partir de ingredientes funcionales (extracto acuoso de las semillas de chicayota y lactosuero), los cuales poseen compuestos bioactivos (péptidos) con potencial antidiabético. Mediante evaluación sensorial, se determinó la relación de extracto de chicayota (previamente tratado térmicamente para la eliminación de saponinas) y suero. A la mezcla obtenida se le agregó pulpa de fresa y stevia como endulzante. Posteriormente, se realizó el análisis bromatológico de acuerdo a la AOAC (1990). Finalmente se realizó la caracterización parcial de la proteína total de la bebida mediante SDS-PAGE y se probó su resistencia a la hidrólisis enzimática con tripsina. Los resultados obtenidos muestran un contenido de proteína (0.79%) y fibra (1.29%) similares a bebidas vegetales comerciales. De acuerdo al análisis electroforético, en la bebida se identificaron tres proteínas de 22, 30 y 120kDa resistentes a la digestión triptica por 16 horas.

Palabras clave: bebida, chicayota, diabetes, lactosuero, péptidos

Área: Alimentos funcionales

ABSTRACT

Diabetes is a chronic disease that contributes to overall mortality in our country. The use of drugs for the treatment of diabetes is associated with undesirable side effects, so food active components for the prevention and/or management of this disease have begun to be studied. The objective of this work was to formulate a functional beverage with functional ingredients (aqueous extract of chicayota's seeds and whey), which have bioactive compounds (peptides) with antidiabetic potential and to determine its chemical proximate composition. By sensorial evaluation, the ratio of chicayota extract (previously heat treated for the saponins removal) and whey was determined. To the mixture obtained strawberry pulp and stevia as a sweetener were added. Subsequently, the bromatological analysis was performed according to AOAC (1990). Finally, partial characterization of the total protein of the beverage was performed by SDS-PAGE and its resistance to enzymatic hydrolysis with trypsin was tested. The results obtained show a protein (0.79%) and fiber (1.29%) content similar to commercial vegetable drinks. According to the electrophoretic analysis of the beverage, three proteins (22, 30 and 120kDa) resistant to tryptic digestion for 16 hours were identified.

Keywords: beverage, chicayota, diabetes, peptides, whey

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una alteración metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica que se acompaña, en mayor o menor medida, de alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, de las proteínas y de los lípidos. La adaptación de la alimentación es uno de los tratamientos fundamentales para las personas con diabetes (OMS, 2016). Junto al tratamiento farmacológico y la práctica de ejercicio físico de forma habitual, una alimentación adaptada a la diabetes es capaz de mejorar y ayudar a normalizar los niveles de glucosa en sangre. A pesar de que los beneficios están claros, todavía existen muchas dudas acerca de cómo llevar a cabo esta alimentación específica, pues no consiste solamente en consumir alimentos saludables, sino que se necesita identificar los principios activos que favorecen su tratamiento y/o prevención. Investigaciones recientes han correlacionado a las proteínas de forma implícita por participar en la regulación de los niveles de insulina en la sangre. Esto se debe a que están constituidas por secuencias cortas de aminoácidos denominados péptidos bioactivos. (Torruco-Uco, 2008).

En un estudio reportado por Silva-Sánchez *et al.*, (2008) los péptidos con actividad antidiabética son aquellos que tienen la capacidad de inhibir la Dipeptidil Peptidasa IV (DPP IV). La DPP IV es una enzima multifuncional implicada en varios procesos celulares como inmunológicos, inflamatorios y endocrinos. La DPP IV es responsable de degradar las principales hormonas encargadas de la liberación de insulina después de la ingesta de alimentos: las incretinas; por lo tanto los inhibidores de la DPP IV actúan como potenciadores de incretinas, debido a que ayudan a incrementar el tiempo de acción de estas hormonas (Stephan *et al.*, 2011). En el mercado existen varios inhibidores de DPP IV que han mostrado muy buenos resultados como agentes antidiabéticos (Huisamen *et al.*, 2011). Sin embargo, existe el riesgo de presentar efectos secundarios, principalmente por la amplia gama de efectos fisiológicos de esta enzima, por lo que la búsqueda de alimentos nutracéuticos que proporcionen péptidos naturales siempre será una alternativa viable para este tipo de padecimientos (Silva-Sánchez *et al.*, 2008).

Existe una gran gama de alimentos funcionales de origen vegetal y animal que poseen estos principios activos pero se encuentran encriptados en sus proteínas nativas. En su mayoría, estos péptidos poseen actividad inhibitoria de la DPP-IV, antihipertensiva, antioxidante y anti proliferativa (Torruco-Uco, 2008). En los últimos años se ha dado un importante valor nutritivo a las semillas de chicayota debido a que son consideradas como fuente de proteína y grasa de bajo costo (Barragán, 2015) sin embargo, debido a la deficiencia que presentan sus proteínas en ciertos aminoácidos se ha optado por mejorar su calidad nutricional mediante el enriquecimiento con lactosuero, el cual es un residuo de la industria láctea que posee un sin número de actividades biológicas cuando sus proteínas son hidrolizadas con tratamientos químicos, enzimáticos y fermentativos (Hernández-Ledezma y Chia-Chien 2013). La formulación de mezclas de semillas y suero de leche permite obtener un mejoramiento de la calidad de la proteína, además de que el uso del lactosuero en bebidas representa una manera de darle valor agregado a este subproducto cuyo destino carece de un aprovechamiento y valorización integral. Por ejemplo, las semillas de chicayota son una importante fuente de proteína (30.17%) y en sus proteínas existe la presencia de péptidos inhibidores de la Dipeptidil Peptidasa IV (DPP-IV) (Herrera, 2015), pero de forma natural contienen saponinas, las cuales le confieren un sabor amargo por lo que se deben eliminar antes de ser consumidas. Se sabe que los tratamientos térmicos de las semillas con vapor permiten la eliminación de las saponinas (Barragán, 2015) y que estos tratamientos son comparables al que utilizan las personas que consumen la semilla tradicionalmente, sin embargo, cuando en los alimentos se han encontrado biomoléculas funcionales, éstas se ven afectadas debido al uso de tratamientos térmicos y la funcionalidad y/o el potencial biológico también se ve alterado de manera significativa.

Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue formular una bebida funcional y determinar su composición química proximal, a partir de ingredientes funcionales (extracto acuoso de las semillas de chicayota y lactosuero), los cuales poseen compuestos bioactivos (péptidos) con potencial antidiabético.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ingredientes. Semillas de chicayota, suero de leche de vaca y fresa. Las semillas de chicayota se sometieron a tratamientos térmicos de vapor durante 20, 30 y 40 minutos, se molieron 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. Se utilizó leche de vaca, para la obtención de suero de leche a partir de queso fresco. Se eligió la fresa ya que es una fruta característica de la región y de una amplia disponibilidad.

Formulación de la bebida. Para la obtención de la leche vegetal, las semillas fueron tratadas térmicamente y se lavaron hasta eliminar la espuma. Se llevó a cabo una molienda en húmedo en una relación 1:10 (g de semilla/mL de agua) y el extracto acuoso se filtró para la obtención de una leche vegetal. A cada uno de los extractos obtenidos se le determinó la actividad ureásica residual de acuerdo al método Caskey-Knapp (1944) modificado por AACC (1969) y Quím. Leticia Comar (Nutrimentos del Sureste, Mérida, Yucatán, México) y se realizó una prueba hedónica para elegir el tratamiento que tuviera mayor aceptación. Una vez determinado el tratamiento térmico se realizaron 3 formulaciones de la bebida y se eligió la de mayor aceptación según una segunda prueba hedónica

Análisis químico proximal. Se determinó la humedad (925.10), cenizas (923.03), contenido de proteína cruda ($N \times 6.25$) (920.87), lípidos (925.85), fibra cruda (920.86) y carbohidratos (939.03), de acuerdo a las técnicas reportadas en el AOAC (1990).

Extracción de proteína total. Se utilizó el protocolo de precipitación y limpieza de proteínas con metanol-cloroformo de acuerdo a Novoa y Sánchez (2011) a fin de obtener el mayor contenido y caracterización molecular óptima de la proteína total.

Cuantificación de proteína. La proteína total de los ingredientes funcionales se cuantificó utilizando el método de Bradford en microplaca con el kit Protein Assay de Bio-Rad de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Digestión con tripsina. Se utilizó la enzima tripsina de páncreas de cerdo (Sigma St. Louis M.O., USA), se suspendieron las proteínas de la bebida terminada en Tris 100mM, pH 8.0 en un agitador orbital, se agregó la enzima y se realizó la digestión por 16h a 37°C. La reacción se detuvo congelando la muestra.

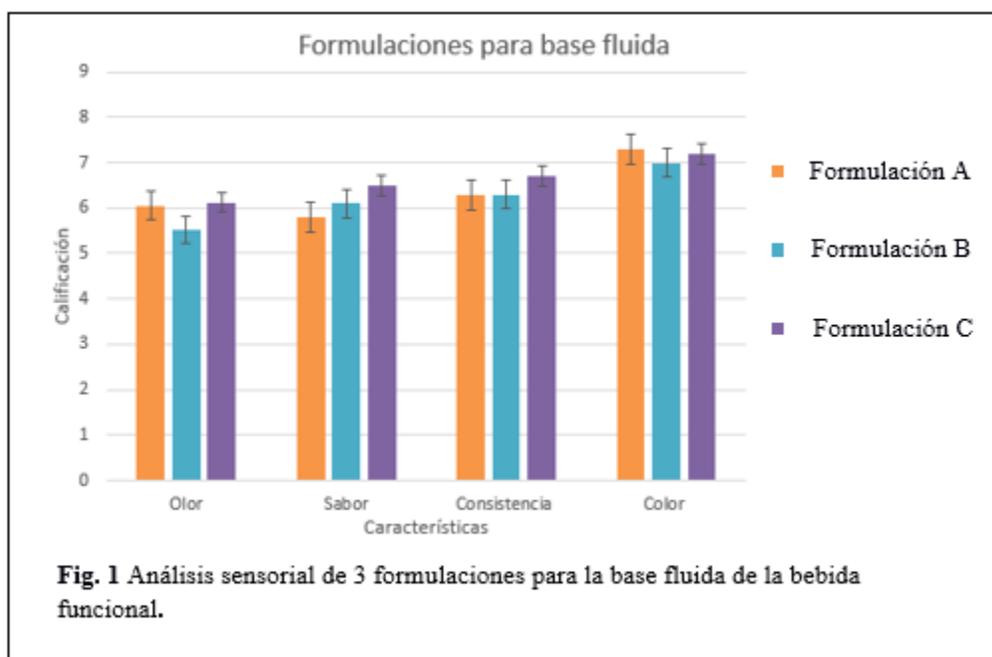
Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE). La electroforesis de proteínas e hidrolizados proteicos en Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) se realizó de acuerdo con el método reportado por Laemmli (1970).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad ureásica y formulación de la bebida. Para la eliminación de las saponinas que le confieren el sabor amargo a las semillas de chicayota, se realizó un tratamiento con vapor saturado a 96°C según lo sugerido por Barragán en el 2015, en este estudio se probaron 6 tiempos como se indica en la Tabla I, concluyéndose que a partir de un tratamiento de 15min a estas condiciones se logra una inactivación de saponinas aceptable.

Tabla I. Efecto del tratamiento térmico con vapor saturado sobre las saponinas presentes en las semillas de chicayota	
Tiempo (min)	Resultado
10	Falta de tiempo en el tratamiento para inactivación de saponinas
15-17	Neutralización de saponinas aceptable
20-40	Sobretreatmento térmico, se neutralizaron las saponinas pero existe la posibilidad de la desnaturalización de las proteínas

Con los resultados de la prueba hedónica de los extractos se concluyó (mediante un ANOVA a una vía) que el tratamiento de 40 min fue el de mayor aceptación al ser el estadísticamente más significativo en la evaluación del sabor (variable de mayor interés) con un índice de confianza del 95%. Con el extracto elegido se llevaron a cabo tres formulaciones (A, B y C). La formulación C fue la que obtuvo mayor aceptación por los panelistas (Fig. 1) con una calificación promedio de 6.6, seguida de la formulación A con un promedio de 6.3 y la menos favorecida fue la formulación B con una calificación promedio de 6.2. La formulación A y B obtuvieron un promedio casi igual. De acuerdo a estos resultados se eligió la formulación C como base fluida para la bebida funcional, a la cual se le agregó fruta característica de la región del Bajío (fresa) y se utilizó Stevia como edulcorante.



Análisis químico proximal. En la Tabla II se muestran los resultados del análisis químico proximal de la bebida terminada que corresponde a la formulación C. Se hizo una comparación con la leche de soja tradicional marca “Ades”. Respecto a esta bebida comercial, podemos observar que presenta un contenido de proteína y fibra ligeramente superiores, sin embargo el contenido de grasa en la bebida de chicayota y lactosuero está 6 veces por debajo de la bebida de referencia y el aporte calórico está a la mitad respectivamente.

Tabla II. Composición g/100mL de la bebida obtenida con base en semillas de chicayota y lactosuero en comparación con la leche de soja marca “Ades”

Información nutrimental por porción de 100mL		
Componente	Bebida en base de semillas de chicayota y lactosuero	Leche de soja “Ades”
Humedad	96.65	87.19
Cenizas	0.45	0.14
Grasa	0.08	0.46
Proteína	0.79	0.62
Fibra	1.29	1.13
Carbohidratos	3.73	4.0
Calorías (kcal)	17.31	39.9

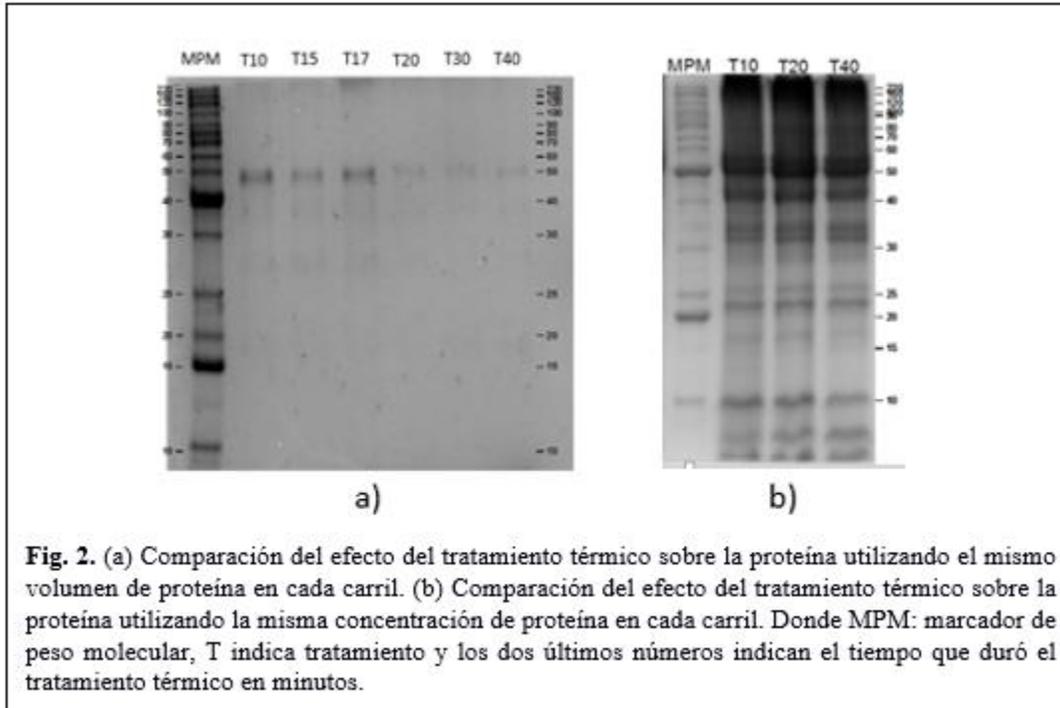
Extracción proteína total.

Tabla III. Contenido de proteína total en la bebida con base en semillas de chicayota y lactosuero mediante dos métodos de cuantificación

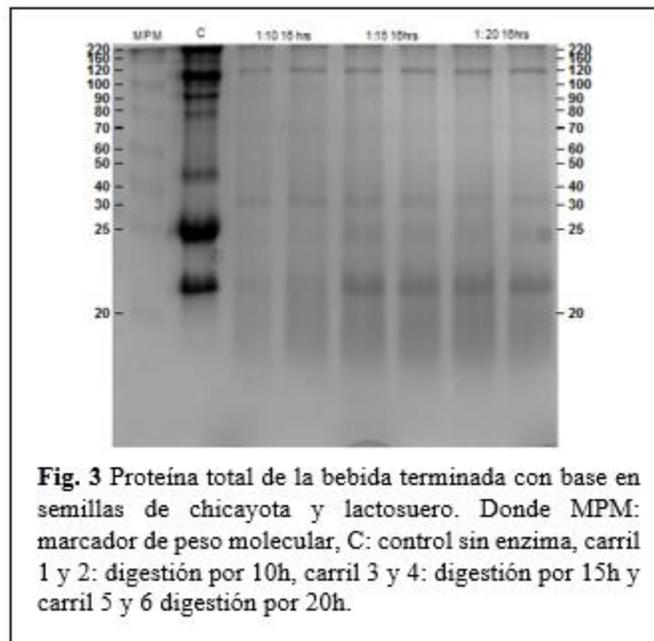
Cantidad de proteína en una porción de 100mL	
Método	mg/mL de bebida terminada
Kjeldahl	0.835±1.124
Bradford	0.795±1.723

-Media ±D.S.
-Medias con diferente literal indican diferencia significativa (Prueba de Tukey $p > 0.005$)

Efecto del tratamiento térmico en la proteína total. En el análisis SDS-PAGE se observó el patrón de bandas para las proteínas principales de los extractos acuosos de las semillas previamente tratadas térmicamente. En este análisis se cargó la misma cantidad de volumen en cada carril y se observa como la intensidad de las bandas disminuye con respecto a la temperatura, sin embargo las dos bandas principales (49 KDa y 27KDa respectivamente) se mantienen en todos los tratamientos Fig. 2a. Se realizó un análisis SDS-PAGE para los tratamientos de 10, 20 y 40 min, pero en esta ocasión se utilizó la misma cantidad de proteína en cada uno de los carriles, esto para observar si igualando la concentración se pudiera observar algún cambio en la expresión, sin embargo como se aprecia en la Fig. 2b el patrón electroforético permanece constante, lo cual nos indica que el tratamiento térmico utilizado para la neutralización de las saponinas tiene un efecto directo sobre la concentración de la proteína pero no así sobre la conformación de la misma.



Digestión triptica de la proteína total de la bebida terminada. Para digerir la proteína se optó por un método enzimático utilizando la tripsina, enzima proteolítica de origen pancreático cuyo uso en proteómica es generalizado ya que se sabe que la mayor parte de la digestión de las proteínas proviene de acciones de enzimas liberadas por el páncreas. La simulación de la digestión nos permite vaticinar el tipo de péptidos que serán liberados durante la digestión y predecir de esta manera la posible acción biológica de los mismos. En la Figura 3 podemos observar la digestión de la proteína total de la bebida terminada durante diferentes tiempos y el efecto de dicha digestión sobre las proteínas de mayor abundancia.



CONCLUSIONES

La bebida formulada con base en semillas de chicayota y lactosuero representa una alternativa de consumo para las semillas de este fruto que pudiera promover su inclusión en la dieta convencional, además de que representa una manera de darle valor agregado al suero de leche de vaca proveniente de industrias lácteas y que en general se presenta como un subproducto cuyo destino carece de un aprovechamiento y valorización integral. Su análisis nutrimental muestra tener un contenido de proteína y fibra similares a bebidas vegetales comerciales, sin embargo, su contenido de grasa y su aporte calórico están muy por debajo de lo reportado para las mismas. En el análisis proteómico, se observa que los tratamientos térmicos utilizados durante la formulación, tienen efecto sobre la concentración de la proteína más no sobre la calidad de la misma. En la obtención de digeridos tripticos se observó que las proteínas de mayor abundancia son resistentes a la digestión por periodos de tiempo prolongados. Al ser las fuentes primarias de la bebida alimentos con péptidos inhibidores de la DPP-IV, se espera en estudios posteriores analizar la actividad *in vitro* de los mismos, esperando que dicha actividad se potencie y se pueda considerar como una bebida funcional en el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2.

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>
- Barragán, I., 2015. Caracterización fisicoquímica de la semillas de chicayota (*Cucurbita argyrosperma* subsp. *sororia*) y su empleo en panificación. Licenciatura. División Ciencias de la vida campus Irapuato-Salamanca. Ingeniería en alimentos.
- Caskey, C.D. y Knapp. F. (1944). Method for determining inadequately heated soybean meal. Ind. Eng. Chem. (Anal Ed.) 16:640-641.
- Hernández J.E. et León J., 1994. Cultures marginalisées 1492: une autre perspective. Collection FAO: Production végétale et protection des plantes n°26. p. 65-76.
- Hernández, B. y Chia, H. 2013. Bioactive Food Peptides in Health and Disease, Edited by Blanca p. cm. ISBN 978-953-51-0964-8
- Herrera, F. 2015. Estudio proteómico de la semilla de Chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*) y sus péptidos encriptados. Posgrado. División Ciencias de la vida campus Irapuato-Salamanca. Maestría en Biociencias.
- Huisamen B, Genis A, Marais E, Lochner A. Pre-treatment with a DPP-4 Inhibitor is Infarct Sparing in Hearts from Obese, Pre-diabetic rats. Cardiovasc Drugs Ther 2001; 25:13-20
- 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.
- 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.
- Silva-Sánchez C, Barba de la Rosa AP, León-Galván MF, deLumen BO, De León-Rodríguez A, González de Mejía E. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seeds. J Agric Food Chem 2008; 56:1233-1240
- Stephan M, Radicke A, Leutloff S, Schmiedl A, Pabst R, von Hörsten S, Dettmer S, Lotz J, Nave H. Dipeptidyl peptidase IV (DPP4) deficiency attenuates diet-induced obesity in rats: Possible implications for the hypothalamic neuropeptidergic system. Beh Brain Res 2011; 216:7123-718
- Torruco J., Guerrer C.L., Betancur D. Funcionalidad biológica de péptidos bioactivos “bioactividad de péptidos y diversidad de fuentes alimentarias”. Editorial Académica Española.