

Efecto de la aplicación de altas presiones en proteína de soya sobre su funcionalidad en la protección de carotenoides.

J. de los Santos-Trinidad^{1,2}, N. Alonso-Carrillo², R. Jiménez-Alvarado³, Francisco Cruz-Sosa², E.J. Vernon-Carter⁴, y A. Román-Guerrero^{2*}

1 Universidad Interserrana del Estado de Puebla, Campus Acahuatlán, 2 Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, 3 Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 4 Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana. arogue@xanum.uam.mx

RESUMEN:

Se evaluó el efecto de la aplicación de altas presiones sobre los cambios estructurales de proteína de soya (S) y su relación con su actividad como agente emulsificante. Dispersiones de proteína (10% p/v) se sometieron a diferentes ciclos de microfluidización (MF), 1-5 ciclos a 20 MPa a 25 °C, los cambios estructurales fueron evaluados mediante espectroscopia FT-IR, DSC y potencial zeta, mientras que la funcionalidad fue comparada con la de la proteína nativa (SN) sobre la capacidad de formación de emulsiones y su estabilidad, así como por el nivel de protección contra degradación de carotenoides. Los resultados derivados del análisis de FT-IR, mostraron que las altas presiones provocaron cambios estructurales en S más pronunciados conforme se incrementaba el número de ciclos aplicados, sin embargo el comportamiento de carga superficial no se vio afectado. Los termogramas mostraron que la MF provocó una disminución en la temperatura de desnaturalización irreversible en S comparado con SN, lo que demuestra un efecto de sensibilización estructural. La capacidad emulsionante se vio disminuida para las emulsiones formadas con la proteína después de un ciclo de MF debido a que presentaron la mayor desestabilización durante el tiempo de almacenamiento, este comportamiento se presentó en sistemas con y sin carotenoides.

Palabras clave: Proteína de soya, DSC, microfluidización, emulsiones, viscosidad.

ABSTRACT:

The effect of the application of high pressures on structural changes in soy protein (S) and its relation with its activity as an emulsifying agent. Protein dispersions (10% w/v) were subjected to different number of cycles of microfluidization (MF), 1-5 cycles at 20 MPa at 25 °C, and the structural changes were evaluated by FT-IR spectroscopy, DSC and zeta potential, while their functionality was compared to the native protein (SN) on the ability to form and stabilize emulsions, as well as the protection against carotenoid degradation. The results from the FT-IR analysis showed that application of high pressures caused more pronounced structural changes in S, as the number of cycles applied was increased, but the surface charge behavior was not significantly affected. The thermograms showed that the MF caused a decrease in the temperature of irreversible denaturation in S compared to SN, demonstrating a structural sensitization effect. The emulsifying capacity was decreased for the emulsions formed with the protein after a MF cycle because they presented the greatest destabilization during the storage time, this behavior was presented in systems with and without carotenoids.

Keywords: Soy protein, DSC, microfluidization, emulsions, viscosity

INTRODUCCIÓN

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes y están presentes en todas las células y en todas las partes de las mismas. La funcionalidad de las proteínas, en términos de aplicaciones en la industria de los alimentos, se basa principalmente en su estructura y arreglo tridimensional, derivados de la orientación en el espacio de las cadenas polipeptídicas. Estas estructuras pueden tener arreglos definidos que son denominados como estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, las cuáles bajo ciertos tratamientos, pueden inducir cambios en su arreglo estructural llevando al proceso de desnaturalización, el cual consiste en la pérdida o modificación de su estructura terciaria o cuaternaria, debido al rompimiento de los puentes que forman dicha estructura. Las proteínas de origen animal y vegetal son empleadas como aditivos en alimentos por sus características funcionales las cuales pueden ser mejoradas mediante cambios estructurales [1]. Todas las proteínas desnaturalizadas presentan una conformación más abierta y en ocasiones mejoran su interacción con el disolvente, por lo que una proteína soluble en agua se hace insoluble en agua cuando se desnaturaliza y tiende a precipitar o viceversa. La desnaturalización de las proteínas se puede producir por diferentes mecanismos como cambios de temperatura, pH, esfuerzos mecánicos, y algunos procesos físicos como la aplicación de ultrasonido o altas presiones. En algunos casos, si las condiciones se restablecen y el proceso de desnaturalización no es tan severo [4]. Por otra parte, las proteínas son capaces de adsorberse en interfases aceite-agua rápidamente debido a que los grupos de aminoácidos presentes en su estructura le permiten permanecer en la interfase aceite-agua estabilizándola por largo tiempo. Este comportamiento ha sido ampliamente estudiado para proteínas animales como las proteínas de leche, las cuales han demostrado efectividad para encapsular diversos compuestos bioactivos de interés para evitar o retardar su oxidación [2]. Sin embargo, el estudio y uso de la funcionalidad de proteínas vegetales para su uso directo no siempre favorece a la estabilidad de los productos finales debido a su estructura y arreglo tridimensional; y debido a que la capacidad emulsionante de las proteínas depende en gran medida de su conformación tridimensional, la adsorción de éstas en una interfase líquida aceite-agua requiere que su molécula presente ciertos “parches” o sitios hidrofóbicos en la superficie de la macromolécula, y que en ocasiones las proteínas globulares de estructura estable como algunas proteínas vegetales, no exhiben buenos comportamientos como agentes emulsionantes en su forma nativa, debido a que los residuos de aminoácidos hidrofóbicos se encuentran proyectados hacia el interior de la molécula dejando los grupos hidrófilos hacia afuera, lo que hace que sean solubles en disolventes polares como el agua [2]. Por lo que la aplicación de tratamientos a altas presiones permitirá modificar su estructura nativa para potenciar su actividad superficial y así promover sus propiedades funcionales como agente emulsionante y su funcionalidad para la protección de carotenoides.

MATERIALES Y MÉTODOS

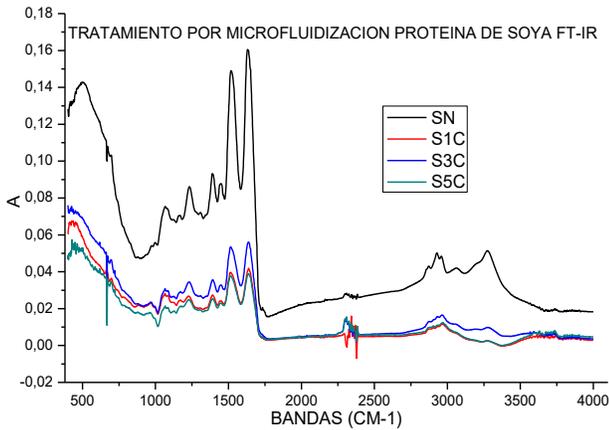
Se prepararon dispersiones de S al 10% p/v, las cuales fueron sometidas en lotes de proteína a altas presiones de MF en un Nano DEBEE, bajo las siguientes condiciones: presión de 20 MPa y 1, 3 y 5 ciclos de microfluidización. Las muestras fueron catalogadas como S1C, S3C y S5C, respectivamente. Las dispersiones tratadas fueron secadas a 50°C en una estufa durante 2 días hasta alcanzar peso constante, posteriormente fueron trituradas en un mortero y tamizadas para su posterior uso. Cada uno de los tratamientos resultantes fue caracterizado por DSC, FT-IR, potencial zeta [2], actividad emulsionante, reología y estabilidad de emulsiones con y sin carotenoides [6]. Para la caracterización térmica de PS por DSC se empleó una velocidad de calentamiento de 10°C/min, en un intervalo de temperatura de 25°C a 200°C, con un flujo de N₂ de 50 mL/min, donde la temperatura de desnaturalización irreversible fue evaluada. Para el análisis de potencial zeta se hizo un barrido de pH y se evaluó el cambio en la magnitud y/o signo de la carga de las dispersiones de PS después de tratarse por MF.

Las emulsiones fueron preparadas con la PN y las muestras tratadas, se empleó una fracción másica de fase dispersa del 10%, donde la fase oleosa consistió de un extracto de semilla de achiote en aceite vegetal como fase dispersa (O) y una dispersión de PS (con o sin MF) al 10% (p/v) como fase continua (W). Brevemente, la fase O se goteó en la fase hasta alcanzar su completa adición a una velocidad de 7,900 rpm y posteriormente se aumentó a 11,400 rpm y se mantuvo durante 10 min en un baño de hielo. La estabilidad de las emulsiones se determinó mediante la evaluación del cambio de diámetro de gota por microscopía óptica y análisis de imágenes y color de las emulsiones durante su almacenamiento a 25°C mediante la determinación de los parámetros CIE Lab.

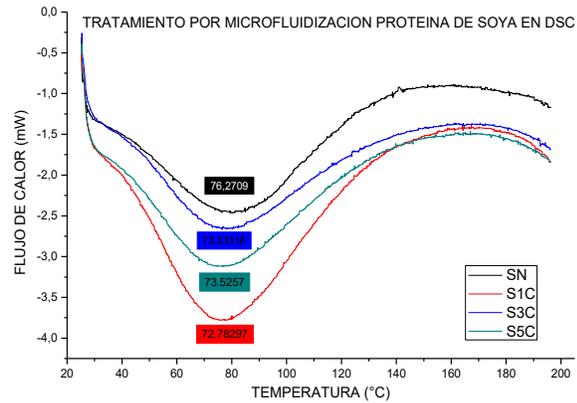
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras presentaron un contenido máximo de humedad de 8% con un contenido de proteína superior al 90% en base seca. Debido a que los análisis de potencial zeta no mostraron diferencia significativa sobre el perfil global y comparado con SN, los resultados no se muestran explícitamente, sin embargo se encontró que el pI de PS fue de 4.52.

Las pruebas FT-IR mostraron los cambios estructurales al someter a las proteínas a MF, las cuales a medida que se aumentaba el número de ciclos se observaban una mayor pronunciación de cambios en comparación con la lectura de la proteína nativa (Figura 1). Los resultados de esta prueba nos permiten observar los cambios estructurales de las proteínas al aplicarles este tratamiento físico.

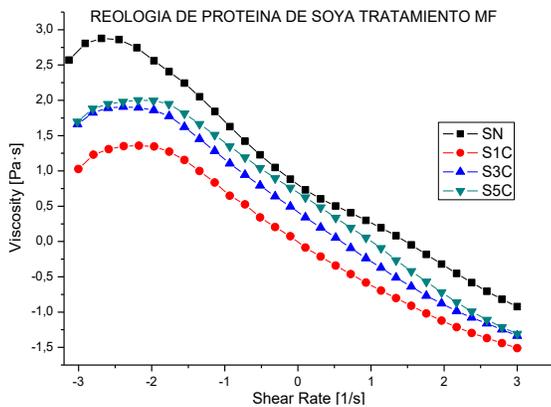


“Figura 1. Espectros de FT-IR para SN, y S después de MF”

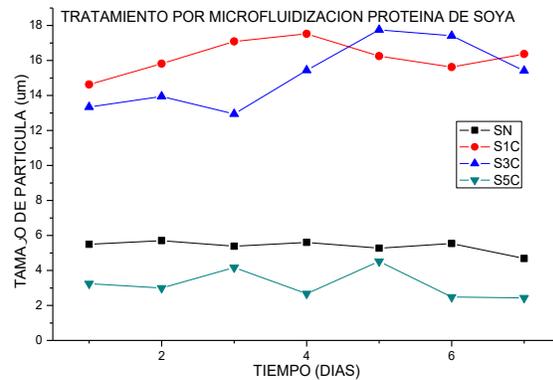


“Figura 2. Termogramas de SN y S después de MF”

Las pruebas de calorimetría diferencial de barrido muestran que con el tratamiento se obtuvieron diferentes temperaturas de desnaturalización irreversible con valores menores comparadas con la nativa (Figura 2).



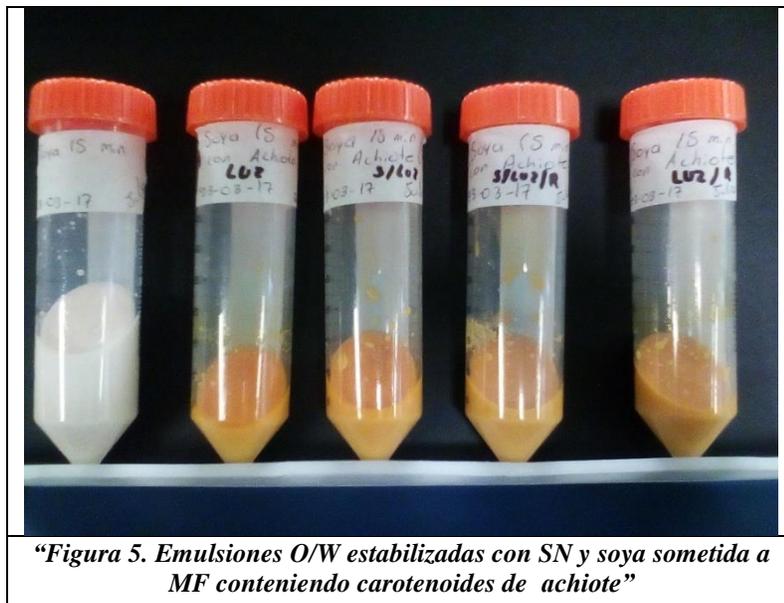
“Figura 3. Curvas de flujo de SN y S tratada por MF”.



“Figura 4. Evaluación de estabilidad de las emulsiones”

La proteína en las pruebas de potencial Zeta se obtuvo ligeros cambios en los perfiles en donde la proteína tratada a 1 ciclo MF y a 5 ciclos MF mostraron perfiles similares a la nativa y en el caso de 3 ciclos MF mostró un ligero aumento teniendo un potencial de 20 en el pH 2 y para el pH 8 el potencial Zeta de las 4 proteínas fue un aproximado de -25 mV.

Para este tratamiento, el número de ciclos de aplicación a la que fue sometida la proteína resultó ser determinante sobre la actividad emulsionante, siendo en este caso la de 5 ciclos se mostró adecuado para inducir cambios estructurales, en la cual se observaron cambios de desplazamiento de señales en el FT-IR (Figura 1) en el número de onda; la temperatura de desnaturalización irreversible determinada por DSC resultó menor para estas condiciones (Figura 2), lo que puede deberse a que la modificación estructural en las proteínas tratadas condujo a una mayor exposición de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos de tal manera que la energía requerida para alcanzar un desplegamiento de la estructura nativa resultó menor[3,7]; sin embargo estas modificaciones llevaron a una mejor capacidad emulsionante y protectora de carotenoides que aquella mostrada por la proteína nativa (Figura 5).



“Figura 5. Emulsiones O/W estabilizadas con SN y soya sometida a MF conteniendo carotenoides de achiote”

Cabe mencionar que el tamaño de gota obtenido del análisis de imágenes resultó estar en un intervalo de 1.5-3 micra para las emulsiones frescas, siendo las muestras formadas con la proteína S5C la que presentó el menor tamaño y la menor variación en el tamaño de gota durante el almacenamiento después de 30 días a 25°C.

De acuerdo a los datos obtenidos por el colorímetro, las emulsiones mostraron un valor de luminosidad (L^*) entre 7.0 y 7.9, mientras que en el caso de las coordenadas a^* (coordenadas rojo/verde) se obtuvieron valores positivos correspondientes al color rojo, mientras que para b^* (coordenadas amarillo/azul), la valoración demostró estar en la zona del color amarillo.

Cabe mencionar que en la muestra que fue sometida a 5 ciclos de MF demostró mantener los valores de a y b con menor variación durante el tiempo de almacenamiento, comparado con los valores encontrados para el sistema formado con la SN.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados de cada una de las pruebas realizadas a la proteína de soya, se puede concluir que al someterlas a altas presiones, la estructura proteica de las mismas cambia considerablemente, siendo de forma particular para este trabajo que la aplicación de 5 ciclos de MF a 20 MPa mejora considerablemente la actividad emulsionante y protectora de compuestos carotenoides de la proteína de soya. Se encontró que los cambios estructurales sufridos por las proteínas, sí afecta el comportamiento que pueden tener en alguna propiedad que se desea mejorar para un uso determinado y que este tipo de tratamientos sensibiliza la estructura de la proteína haciendo que sea más susceptible de desnaturalización o de reorganización en su estructura y distribución espacial. Estos resultados proveen información relevante sobre el efecto de algunas tecnologías que involucran altas presiones sobre el procesamiento de alimentos, ya que podría brindar información sobre la funcionalidad y estabilidad de estos compuestos en una matriz alimentaria.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACyT por el financiamiento otorgado para la realización del presente trabajo, a través del proyecto CB-2015 236565.

BIBLIOGRAFÍA

1. Estrada, M. (2002). Funcionalidad de hidrolizados enzimáticos de subproductos de carpa dorada (*Carassius auratus*). Universidad Autónoma Metropolitana.
2. J.I. Boye, S. Aksay, S. Roufik, S. Ribéreau, M. Mondor, E. Farnworth, S.H. Rajamohamed. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43, 537-546, 2010.
3. Lampart-Szczapa, E. (2001). Chemical and functional properties of food proteins. (Z. E.Sikorski, Ed.) Boca Raton, Florida, United States of America: CRC Press
4. Liang, H.N., Tang, C.H. pH-dependent emulsifying properties of pea [*Pisum sativum* (L)] proteins. *Food Hydrocolloids* 33, 309-319, 2013.
5. Ospina, J., Rondón, A., (2006). Guía metodológica para realizar análisis mediante el calorímetro de barrido diferencial (DSC Q10), como servicio de extensión a la industria nacional por parte de la escuela de Ingeniería Química, UIS. Bucaramanga.
6. Silverstein, R., Clayton, G. (1991). Spectrometric Identification of Organic Compounds. JOYHN WILEY & SONS, INC. United States of America.
7. Timothy J Mason, Enrique Riera, Antonio Vercet, Pascual Lopez-Buesa (2005). Application of Ultrasound Emerging Technologies for Food Processing, 2005, Pages 323-351.