UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

UNIVERSIDAD DE COLIMA

Universidad de Guanajuato
División Ciencias de la Vida

XV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos

INFLUENCIA DE LA FUERZA IONICA Y TRIS SOBRE LA SOLUBILIDAD Y CARGA DEL AISLADO DE PROTEÍNA DE SOYA

Morales-Hernández, N.[a], Alcaráz-López O. A.[a],
Lugo-Cervantes E. C.[a], Espinosa-Andrews, H.[a]*.

[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Unidad de Tecnología de Alimentos. Av. Normalistas 800, Colinas de la Norma, C.P. 44270, Guadalajara, Jalisco, México.
* hespinosa@ciatej.net.mx.

RESUMEN:

En este trabajo se evaluó el efecto de fuerza iónica y Tris sobre la solubilidad (%) del aislado de proteína de soya (APS) y cargas del biopolímero. Doce tratamientos se analizaron por un diseño factorial 3^2, para evaluar el efecto de los factores en estudio NaCl (150 – 300mM) y concentración del buffer Tris-HCl (50 – 100mM). Las mejores condiciones para un mayor porcentaje de solubilidad se generaron en el tratamiento 11 a concentraciones de 300mM de NaCl y 100mM Tris-HCl donde con un 79.21% de solubilidad, mientras en el tratamiento 10 (solo agua deionizada) obtuvo el 40.82%. No obstante al evaluar la carga de los 12 tratamientos de APS a través del parámetro de Potencial zeta (ζ) a diferentes valores de pH (2.0 – 8.0), se presenta una disminución en éste conforme varían las concentraciones de sales y de Tris, en el tratamiento 11 se obtuvo una escala de 17.83 a -22.83mV con pI=3.59 mientras que el tratamiento 10 fue de 24.70 a -39.17mV con pI=3.81 durante el rango de pH de 2.0 – 8.0 respectivamente, pero al realizar una electroforesis (SDS-PAGE) se observa que las fracciones son las mismas. El efecto de la fuerza iónica y concentración de Tris afecta en el comportamiento de las fracciones del APS y esto puede repercutir en sus propiedades tecnofuncionales.

ABSTRACT:

In this work we evaluated the effect of ionic strength and Tris on solubility (%) of soy protein isolate (SPI) and biopolymer's charges. Twelve treatments were analyzed by a factorial design 3 ^ 2, to evaluate the effect of factors NaCl (150 - 300 mM) and the concentration of Tris-HCl buffer (50 - 100mm). The highest solubility was found in the treatment 11 to 300 mM NaCl and 100 mM Tris-HCl which was obtained 79.21% solubility, while in treatment 10 (deionized water) is obtained only 40.82%. However assessing the charge of the 12 treatments of SPI through zeta potential parameter (ζ) at different values of pH (2.0 - 8.0), there is a decrease in this range as the concentrations of salts and Tris, in 11 treatment was obtained a scale of 17.83 a -22.83mV with pI = 3.59 while the treatment at 10 was of 24.70 a -39.17mV with pI = 3.81 over the pH range of 2.0 - 8.0 respectively, but to perform gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed that the fractions are the same. The effect of ionic strength and concentration of Tris affects behavior of SPI fractions and this may affect their technofuntional properties

Palabras clave:

Aislado de proteína de soya, potencial zeta, solubilidad.

ÁREA: Alimentos funcionales.

INTRODUCCIÓN:

Las proteínas de soya son usadas ampliamente en aplicaciones como ingredientes por su funcionalidad, pero con el enfoque actual del consumidor sobre la salud y nutrición, estos ingredientes son usan ampliamente para mejorar la nutrición (Russel et al., 2006). Contiene la mayoría de los aminoácidos esenciales además de componentes biológicos activos como isoflavonas, lecitinas, oligosacáridos y fitoesteroles (Lam, 2004).

Es uno de los productos más valiosos en agricultura y económicamente, debido a su composición única y usos múltiples en el área de alimentos. Son de interés particular porque imparten una alta funcionalidad en sistemas alimentarios para obtener productos con mejor calidad (Molina et al., 2002).

Dentro de las propiedades tecnofuncionales del APS están su capacidad hidratante, solubilidad, estabilidad coloidal, gelación, emulsificación, espuma y adhesión/cohesión. Además se aplica como sustituto de grasa en productos cárnicos, lácteos, en productos a base de cereales y en formulaciones para niños (Martins and Netoo, 2006).

La manera en la cual se comportan en un sistema alimenticio depende de las propiedades físicas y químicas de las proteínas bajo ciertas condiciones. El entendimiento de los estados fisicoquímicos e interacciones de la proteína es necesaria para predecir el comportamiento funcional de los productos proteicos. La solubilidad de los productos de soya depende de los estados fisicoquímicos de las moléculas de proteína las cuales se pueden estar o no favorecidas así como de condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura que en conjunto puede dar información importante para identificar y seleccionar la materia prima para el desarrollo de producto (Lee et al., 2003).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Preparación:

Se adquirió APS con min. 90% de proteína (América Alimentos, Guadalajara, México), Tris Electrophoresis purity (Biorad,). Para la preparación de las muestras, se realizó de acuerdo a la metodología de (Lam et al., 2008) con algunas modificaciones, variando NaCl (150 – 300mM) y concentración del buffer Tris-HCl (50 – 100mM) de acuerdo al tratamiento. El APS se preparó dispersándolo al 4% (p/p) en buffer Tris-HCl a pH 8.0 y con NaCl. Se dejó agitando a temperatura ambiente durante 1h, la fracción insoluble se separó centrifugando a 11000g por 40min a 10°C. El sobrenadante se recolectó y se refrigeró previo a su análisis. Se determinó la cuantificación de solubilidad (%), Potencial ζ (mV) y el perfil electroforético.

Solubilidad:
La solubilidad se determinó de acuerdo a las condiciones de fuerza iónica NaCl (150 – 300mM) y concentración del buffer Tris-HCl (50 – 100mM) en los doce tratamientos, liofilizando un volumen de 3mL del sobrenadante (v/p). La solubilidad fue calculada como el porcentaje de distribución de proteína en el sobrenadante sobre el contenido total de proteína en la dispersión. Se realizó por triplicado.

Potencial-ζ:
Se determinó el potencial ζ en función del pH, utilizando un equipo de movilidad electroforética Zetasizer Nanoseries ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) equipado con un sistema de titulación automática MTP-2 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) a 20°C. Se prepararon diluciones 1/10 y las alícuotas fueron de 10mL de cada tratamiento las cuales se titularon con soluciones valoradas de HCl 0.1N ó 0.5N y NaOH 0.1N en un intervalo de pH de 2.0 a 8.0 ± 0.1 unidades. Las mediciones de titulación se reportan como el promedio ± desviación estándar de las mediciones realizadas de dos muestras independientes con tres mediciones realizadas por corrida.

Electroforésis:
Se realizó un gel de poliacrilamida-sodio docecil sulfato (SDS_PAGE) bajo condiciones reductoras usando DDT como agente reductor a una concentración de 12%. Se corrió el gel usando una base de Tris-glicina. Los tratamientos de soya se prepararon con buffer de carga Laemli 1X. Este gel solo mostraría cambios en la proteína por el efecto de la fuerza iónica y Tris-HCl en cada tratamiento.

Diseño experimental y Análisis Estadístico:
Se realizó un diseño factorial de 3 niveles 3^2 donde los factores de estudio fueron fuerza iónica por NaCl (0, 150 y 300mM) y concentración del buffer Tris-HCl (0 , 50 y 100mM). Se utilizó Statgraphics Centurion XV Versión 15.2.06 para realizar el análisis de varianza de los datos obtenidos con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:
A continuación se presenta en la Tabla 1 los tratamientos y resultados del diseño experimental para la solubilidad y valores de potencial ζ a pH 2.0 y pH 8.0, así como el pH del punto isoeléctrico (pI) de cada tratamiento.

Solubilidad:
Los factores sales y Tris fueron en ambos casos altamente significativos ($p<0.0000$), influyendo en la variable de solubilidad (Tabla 2). Presentando una tendencia conforme aumenta el contenido de sales y la concentración del Tris-HCl el porcentaje de solubilidad incrementa (Fig. 2).

Tabla 1. Resultados de Solubilidad, Potencial ζ y pI de 12 tratamientos

Tratamientos	NaCl (mM)	Tris - HCl (mM)	% Solubilidad	Potencial ζ (mV) pH 2.0	Potencial ζ (mV) pH 8.0	pH de carga 0 (pI)
1	150	50	51.90	19.00±0.85[c]	-26.47±0.38[c,d]	3.62
2	0	50	42.88	21.00±0.95[f]	-32.60±1.14[b]	4.91
3	150	0	39.62	9.20±0.94[a]	-27.10±0.26[c]	2.73
4	150	50	52.37	16.33±0.92[c,d]	-26.50±0.70[c,d]	3.33
5	0	100	51.32	19.47±0.25[d,e]	-30.50±0.56[c]	3.76
6	300	0	52.18	10.07±1.19[a]	-22.37±0.38[e,f]	2.81
7	150	100	63.10	15.50±0.17[b,c]	-24.37±0.65[d,e]	3.52
8	150	50	51.60	15.60±0.35[b,c]	-22.53±0.76[e,f]	3.51
9	300	50	67.79	13.97±0.23[b]	-21.67±0.06[f]	3.61
10	0	0	40.82	24.70±1.30[g]	-39.17±1.46[a]	3.81
11	300	100	79.21	17.83±0.61[d,e]	-22.83±0.21[e,f]	3.59
12	150	50	52.50	11.13±0.47[a]	-22.03±0.74[e,f]	3.37

Las letras a,b,c,d,e,f,g entre los tratamientos por columnas señalan diferencias significativas

Tabla 2. Análisis de Varianza para % Solubilidad

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Sales	686.084	1	686.084	261.60	0.0000
B:Tris	620.37	1	620.37	236.54	0.0000
AA	44.506	1	44.506	16.97	0.0045
AB	68.3102	1	68.3102	26.05	0.0014
Error total	18.3586	7	2.62265		
Total (corr.)	1437.63	11			

R-cuadrada = 98.723 porciento
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 97.9933 porciento

Como se muestra en la Tabla 1. El tratamiento11 presentó el 79.21%, por los niveles más altos en NaCl (300mM) y Tris (100mM) y conforme disminuyen ambas concentraciones la solubilidad también. En el caso del tratamiento 10 que no se le incorporaron sales ni buffer, su % de solubilidad fue de 40.82. La solubilidad de las proteínas depende inclusive de su tratamiento de obtención además de que es influenciado por la concentración de sales (Jian et al., 2010). Las concentraciones que se evaluaron en este estudio fueron bajas debido a las evaluaciones posteriores de Potencial zeta.

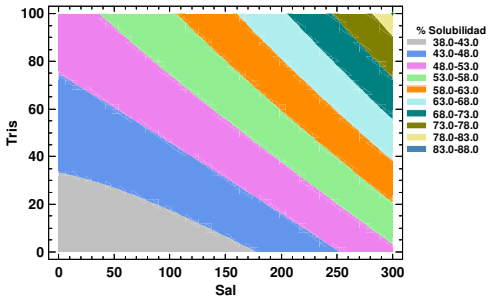

Fig. 1. Contornos de la superficie de % Solubilidad

Potencial-ζ:

En la Tabla 1 se observan los valores de potencial ζ solo a pH 2.0 y a pH 8.0, puntos de la curva. En la Figura 2 se muestra el comportamiento del APS en función de toda la rampa de pH para dos tratamientos.

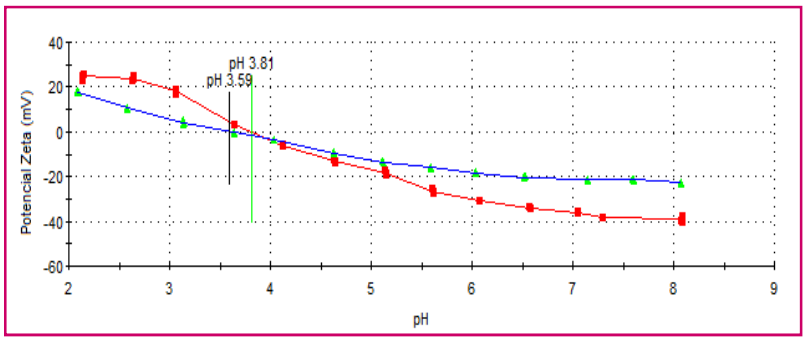

Fig. 2. Medición del Potencial zeta de tratamientos de APS en intervalos de pH

Como se muestra en la Figura 2 se muestra el comportamiento del APS (tratamientos 10 y 11) con respecto al potencial-ζ en función del pH, la línea azul es el tratamiento 11 (pI= 3.59) y en línea roja el tratamiento 10 (pI= 3.81), donde se observan pequeñas variaciones pero esto posiblemente relacionado a la solubilización del APS. La influencia del pH en el potencial-ζ va influyendo en las proteínas de soya produciendo fuerzas repulsivas entre las moléculas y consecuentemente pueden contribuir a su solubilidad. La menor solubilidad está en el punto isoelétrico donde las fuerzas electrostáticas repulsivas son insuficientes para evitar la agregación y el agua interactúa poco con las moléculas de las proteínas (Pelegrine and Gasparetto, 2005).

Electroforesis:

En la Figura 3 se puede observar que las muestras procesadas de soya tienen un patrón electroforético muy similar, presentando bandas que corresponden a poli péptidos que varían de aproximadamente de 75 kDa hasta poco menos de 25 kDa, con excepción de la muestra APS la cual presenta el mismo patrón electroforético, incluyendo un barrido posiblemente debido a degradación proteica, y mostrando indicios de proteínas mayores a 250 kDa, que permanecieron en la zona de aplicación, siendo esto no observado en las muestras de soya que recibieron el tratamiento, por lo cual conlleva a que están presentes subunidades de la glicinica (seis ares 20-a35kDa) y β-conglicina (53 a 76kDa).

La diferencia de intensidad entre la misma fracción entre los diferentes tratamientos se puede relacionar a un mayor contenido del a fracción conforme incrementa la intensidad. (Sadeghi et al., 2006).

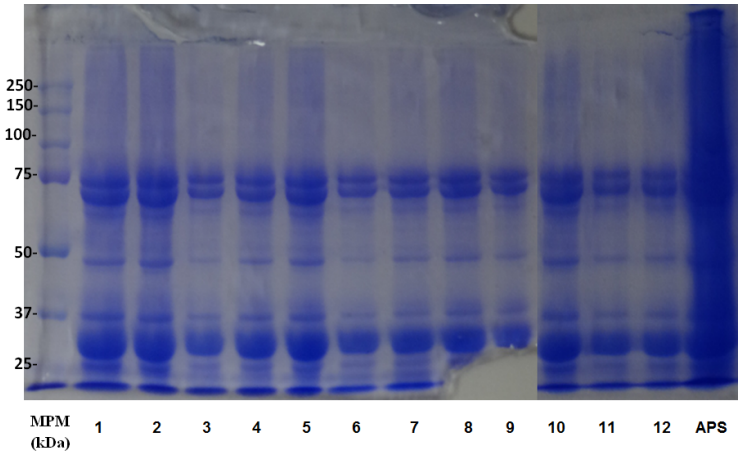

Fig. 3. Patrones electroforéticos de tratamientos y APS.

CONCLUSIONES

Las proteínas de soya dependiendo de las condiciones a las que se someta pueden formar agregados o interacciones entre las mismas subunidades permitiendo la formación de complejos solubles afectándose parámetros de solubilidad y potencial z, repercutiendo en el punto isoeléctrico debido a las diferentes fracciones y a la cantidad que se solubilizaron, repercutiendo en sus propiedades funcionales.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Fondo de Ciencia Básica SEP – CONACYT por el financiamiento de este trabajo a través del convenio CB–2008–01/104109.

REFERENCIAS

1. Lam, M., Paulsen P., and Corredig, M. 2008. Interactions of Soy Protein Fractions with High-Methoxyl Pectin. J. Agric. Food Chem. 56, 4726 – 4735.
2. Lee, K.H., Ryu, H.S. and Rhee, K.C. 2003. Protein Solubility Characteristics of commercial soy protein products. JAOCS, Vol. 80, No. 1. 85 – 90.
3. Martins, V.B. and Netto, F.M. 2006. Physicochemical and functional propertiesof soy protein isolate as a function of water activity and storage. Food Research International, 39, 145 – 153.
4. Molina, E., Defaye, A.B. and Ledward, D.A. 2002. Soy protein pressure – induced gels. Food Hydrocolloids. 16, 625 – 632.
5. Russell, T.A., Drake, M.A. and Gerard, P.D. 2006. Sensory Properties of Whey and Soy Proteins. J. Food. Sci. Vol. 71, No. 6. S447 – S455.
6. Sadeghi, A.A., Nikkhah, A., Shawrang, P. and Shahrebabak, M.M. 2010. Protein degradation kinetics of untreated and treated soybean meal using SDS-PAGE. Animal Feed Sci and Tech. 126, 121 – 133.