

## Efecto de la desnaturalización térmica e hidrólisis química de proteínas sobre la cinética de hidrólisis enzimática

<sup>1</sup>Amanda P. Guerrero P\*, <sup>1</sup>Jeffersson Paz N., <sup>1</sup>Luz Stella Muñoz A., <sup>2</sup>Rubén A. Vargas Z., <sup>3</sup>Ana C. Agudelo H.

<sup>1</sup>Departamento de Ciencia Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. <sup>2</sup>Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad del Valle, Cali. <sup>3</sup>Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ingeniería y Administración, Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. \*e-mail: apguerrerop@unal.edu.co

**Palabras clave:** Desnaturalización, procesamiento, proteínas, productos lácteos, hidrólisis, propiedades térmicas.

Los aislados hidrolizados de proteína tienen un amplio rango de aplicación como ingredientes en la formulación de alimentos especiales (dietas purificadas, suplementos proteicos, entre otros) ya que mejoran la digestibilidad de la proteína y disminuyen las propiedades alergénicas. La funcionalidad de los péptidos provenientes de hidrolizados proteicos depende fundamentalmente del control del proceso de hidrolizado en aspectos como tamaño molecular, estructura y secuencias específicas de aminoácidos.

### Metodología

La proteína láctea fue aislada mediante coagulación enzimática con renina comercial. La cuajada obtenida fue liofilizada durante 72 h a 20°C, se redujo el tamaño de partícula inferior a 1 mm. Para la obtención del aislado de proteína cárnica se emplearon 2 kg, los cuales se liofilizaron durante 72 h a -20°C, se redujo a un tamaño de partícula menor a 1 mm, posteriormente a los aislados cárnico y lácteo se les extrajo la grasa libre por el método Soxhlet con uso de éter de petróleo como solvente a 40°C durante 6 h. Se usaron como enzimas pepsina de mucosa gástrica porcina 0.7 FIP-U/mg (Merck) y pancreatina (Sigma). La hidrólisis química (HQ) se hizo a diez, veinte, treinta, cuarenta y cincuenta minutos, con una solución de NaOH 1M a 80°C. La desnaturalización térmica (DT) se afectó cada diez minutos hasta cincuenta minutos, a una temperatura de 80°C, para ambos aislados; las muestras se analizaron por triplicado. Para la recuperación de la proteína, después del proceso de desnaturalización, la solución fue llevada hasta un pH de 4.5 para lograr la coagulación de las proteínas.

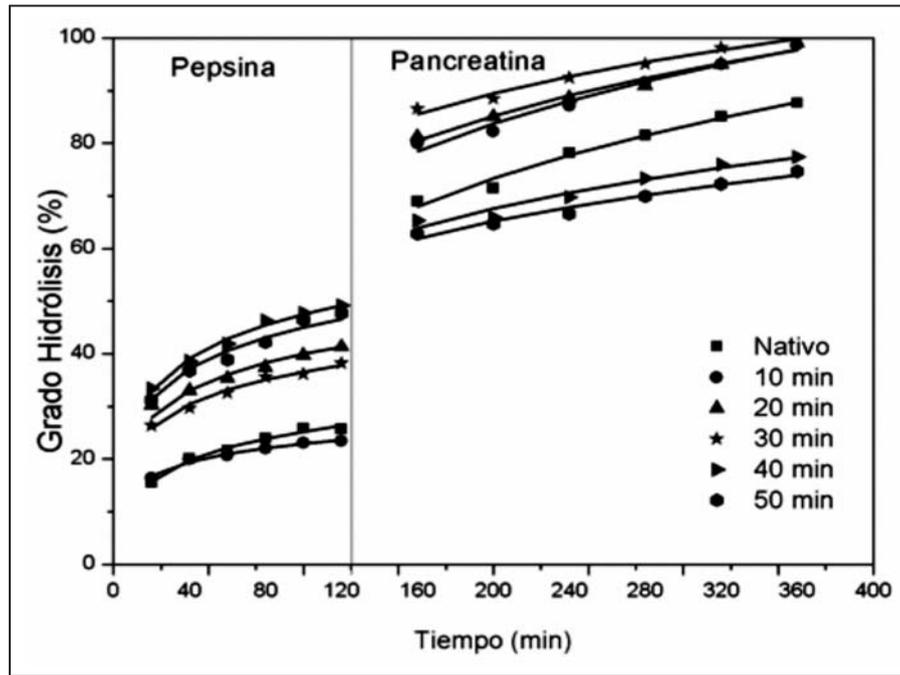
Para la caracterización proximal de los aislados proteicos y de los recuperados de la desnaturalización térmica y química se utilizó el método de AOAC números 934.01, 942.05 y 976.05. El peso molecular de los aislados hidrolizados químicamente fue determinado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, se emplearon marcadores de peso estándar de 14.2 a 520 kDa. Se hizo la hidrólisis enzimática en pepsina, con una relación enzima/proteína de 1:67, en una solución búfer fosfato pH 2 incubada por 2 h a 39°C. La hidrólisis con pancreatina se efectuó con una relación enzima/proteína de 1:30 en una solución búfer fosfato pH 6.8 incubada por 4 h a 39°C. El grado de hidrólisis (GH), una medida indirecta de la digestibilidad, se determinó mediante el método de espectrofotometría UV, en el cual el número de grupos aminos (NH<sub>2</sub>) liberados se determina por la reacción con ácido trinitro-benzeno-sulfónico (TNBS) y se creó una curva de calibración con empleo de seis soluciones de L-leucina de 0.5-1.5 mM y se encontró un modelo matemático lineal para la determinación de los equivalentes de enlaces peptídicos. Las medidas MDSC se hicieron en crisoles herméticos de aluminio de 6 mm, y se empleó un crisol vacío como referencia y una relación de 4 mg de muestra por 10 µl de solución búfer pH 7; el barrido se afectó en rangos de temperatura de -20°C a 140°C con un flujo de nitrógeno de 50 ml/min.

### Resultados

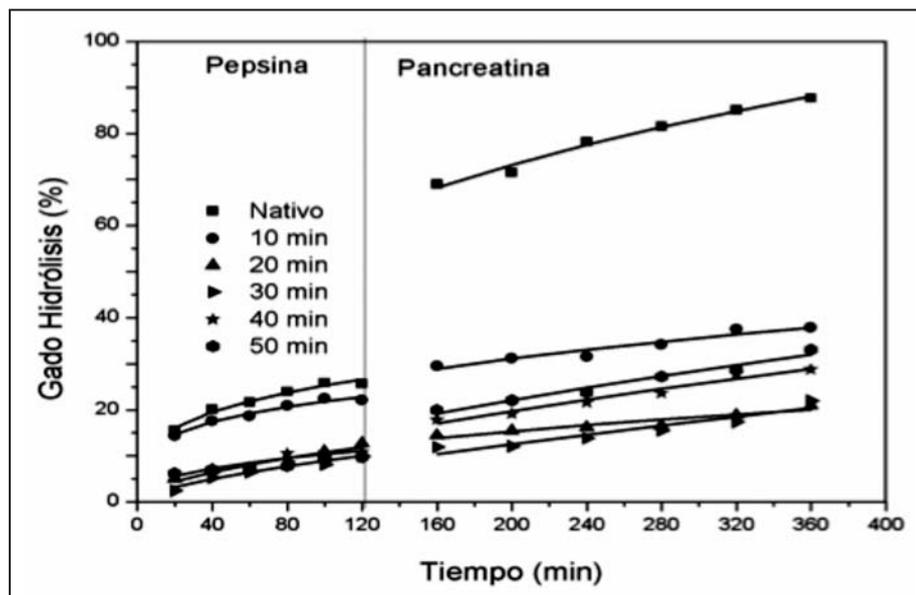
El análisis proximal mostró altos porcentajes de proteína cruda, entre 91% y 95%, para el aislado cárnico nativo y para las muestras con el tratamiento HQ y entre 68 y 92% para el aislado lácteo nativo y las muestras con el tratamiento HQ. La técnica de electroforesis mostró que el peso molecular de los aislados HQ se encontraba entre 14kDa y 29 kDa.

En la Figura 1 se observa que los aislados cárnicos sometidos a tratamientos DT a veinte minutos y cincuenta minutos favorecieron la cinética de la hidrólisis enzimática en pepsina respecto al aislado nativo. Con pancreatina los tratamientos de diez, veinte y treinta minutos mostraron mayor grado de hidrólisis; en contraste los tratamientos de cuarenta y cincuenta minutos disminuyeron la cinética de hidrólisis.

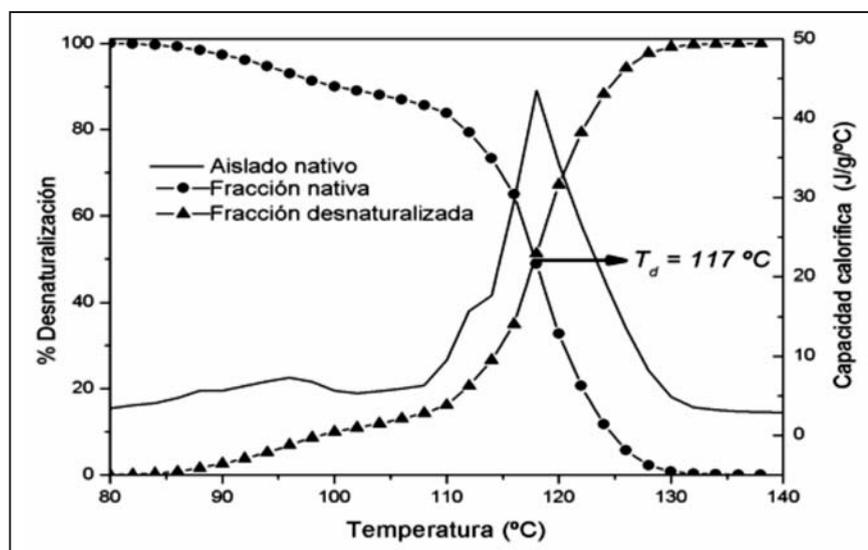
En la Figura 2 el aislado cárnico en pepsina sometido a diez minutos de tratamiento HQ tiene un grado de hidrólisis similar al aislado nativo, mientras que los sometidos a mayores tiempos de tratamiento disminuyeron la cinética de hidrólisis. Los aislados cárnicos en pancreatina sometidos a los cinco tiempos de tratamiento HQ disminuyeron drásticamente la cinética de hidrólisis.



**Figura 1.** Grado de hidrólisis enzimática, en pepsina y pancreatina, del aislado cárnico nativo y de los aislados sometidos a diferentes tiempos de DT.



**Figura 2.** Grado de hidrólisis enzimática en pepsina y pancreatina del aislado cárnico nativo y de los aislados sometidos a diferentes tiempos de HQ.



**Figura 3.** Termograma MDSC y variación con la temperatura de la fracción nativa y desnaturalizada del aislado cárnico nativo.

El grado de hidrólisis de los aislados lácteos tanto nativo como sometidos a DT en pepsina presentaron un ligero incremento respecto del aislado nativo. Para los aislados lácteos con tratamiento DT en pancreatina y HQ en pepsina, el GH no mostró diferencia significativa entre ambos tratamientos. El GH en pancreatina disminuyó en los aislados lácteos HQ respecto del aislado lácteo nativo. El termograma MDSC del aislado cárnico nativo (Figura 3) mostró una temperatura media de desnaturalización térmica ( $T_d$ ) de 117.63 °C y una entalpía de 650.09 J/g. Estos mismos parámetros para el aislado lácteo nativo fueron de 186.69°C y 826.2 J/g, respectivamente. En la Figura se observa la disminución de la fracción nativa con la temperatura y el incremento de la fracción desnaturalizada del aislado cárnico nativo. Los termogramas MDSC de los aislados nativos, así como de los sometidos a los diferentes tratamientos de desnaturalización, muestran correlación entre el grado de hidrólisis y los parámetros térmicos evaluados.

### Conclusión

Entre los tiempos y las temperaturas estudiados, el grado de hidrólisis de las proteínas cárnica y láctea desnaturalizadas térmica y químicamente mostró correlación con los parámetros evaluados con MDSC, lo cual permite concluir que esta técnica puede ser usada para realizar seguimiento del estado de desnaturalización por diferentes procesos.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a la División de Investigación (DIPAL) de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira la financiación de este trabajo a través del proyecto código Quipú 2020100626. A los Laboratorios de Nutrición Animal y Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira y al Laboratorio de Transiciones de Fase de la Universidad del Valle el apoyo en el desarrollo experimental de este trabajo. A la estudiante Julieta Torres del doctorado en Ciencias Agropecuarias; UN-Palmira se agradece su colaboración en las medidas con la técnica PAGE.