



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Detección de la albúmina 2S en
aislados proteicos de ajonjolí

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A
ANGELES BELEGUXAIBA BAZÁN GÓMEZ



México, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Hermilo Leal Lara
Vocal	Amelia Farrés González Saravia
Secretario	Arturo Navarro Ocaña
1er Suplente	Felipe Cruz García
2º Suplente	Luz Sandra Sánchez del Angel

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología. Conjunto E. Facultad de Química. UNAM.

Dra. Amelia Farrés González-Saravia
Asesor de tema

M. en C. Idalia Flores Argüello
Supervisor Técnico

Angeles Beleguixaiba Bazán Gómez
Sustentante

Dedicatoria

A mis padres por el esfuerzo tan grande que han hecho en brindarme todo en esta vida y que no me falte nada; por su compañía, consejos, comprensión, apoyo y cariño. Porque no hay manera de agradecer todo lo que han hecho sino con los frutos de ese trabajo... Esto es para ustedes. ¡Los amo mucho!

A mi hermano Pedro por su apoyo, consejos, complicidad, comprensión, cariño e infinita paciencia. Por todos esos momentos buenos y malos que hemos pasado juntos que no han hecho crecer y ser más unidos. ¡Te quiero mucho!

A mi abuelita por su amor y cariño, por todas aquellas inolvidables conversaciones que compartimos, por escucharme y apoyarme en todos los momentos.

Agradecimientos

A Dios por enseñarme el camino cuando todo estaba oscuro.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizar mis estudios y ser parte de su casa.

A la Doctora Amelia Farrés por permitirme realizar la tesis, por su apoyo, comprensión y paciencia.

A Idalia Flores por la asesoría técnica brindada en la realización de este proyecto, y más aún por todos los consejos que me has dado, por tu comprensión, cariño, paciencia, alegría y sobretodo tu amistad. ¡Muchas gracias!

A Julieta Sandoval por la asesoría brindada, por tu paciencia, consejos y amistad.

A mi hermano Pedro por siempre estar conmigo, por tus consejos, apoyo, regaños merecidos, enseñanzas, alegría y todo ese cariño que me has brindado, no hay manera de agradecerte todo... ¡GRACIAS!

A mis inseparables amigas; Adriana Vázquez y mis brujitas Adriana Navarro, Marisol Briones y Silvia Armenta. Gracias por la amistad que hemos formado a lo largo de todos estos años, por su apoyo en los momentos difíciles, confianza, comprensión, consejos, enseñanzas, por reír conmigo, escucharme, soportarme y ser como son. ¡Muchas gracias! ¡Las quiero mucho!

Al inolvidable grupo 11; Lorena E, Pedro G, Pepe C, Daniel S, Haruichi W, Ricardo T, Fabiola A, Itzel M y todos aquellos que con los que caminé y compartí momentos increíbles desde el primer día que llegué a la Facultad.

A Katy, Aideé e Israel por brindarme su cariño y amistad y por todos los buenos momentos que hemos pasado en el laboratorio.

A Carmen F, Carolina P y Denise C, por su amistad tan valiosa, cariño, apoyo, asesoría y por esos consejos que nunca olvidaré.

A mis inseparables amigos Luis Francisco G, Jorge Adrián A, Tania I, Luis Enrique O, Johana T y Rebeca C, que siempre han estado conmigo y me han apoyado a lo largo de todos estos años. ¡Gracias por su amistad!



ÍNDICE GENERAL

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
3.	MARCO TEÓRICO	4
3.1	Ajonjolí	4
3.1.1	Generalidades	4
3.1.2	Aspectos Botánicos	4
3.1.3	Composición	5
3.1.4	Usos	5
3.1.5	Proteínas del ajonjolí	6
3.2	Aislados proteicos	7
3.2.1	Métodos de obtención	7
3.2.1.1	Solubilidad de las proteínas.	10
3.2.1.2	Influencia del pH	11
3.2.1.3	Influencia de la fuerza iónica	12
3.2.1.4	Influencia de la temperatura	12
3.2.1.5	Clasificación de las proteínas en función de su solubilidad.	12
3.3	Proteínas de reserva.	12
3.3.1	Generalidades	12
3.3.2	Características de las proteínas de reserva de la semilla.	13
3.3.3	Proteínas de reserva de la familia de las albúminas.	14
3.3.4	Proteínas de reserva de la familia de prolaminas.	14
3.3.5	Proteínas de reserva de la familia de las globulinas.	15
3.3.6	Proteínas de reserva de la familia de las glutelinas	16
3.4	Familias de proteínas alergénicas en alimentos vegetales	16
3.4.1	Superfamilia de prolaminas	18
3.4.2	Superfamilia de cupinas	18
3.4.3	Familia Bet v1	19
3.5	Alergias alimentarias	19
3.5.1	Reacciones inmunológicas (Alergia alimentaria verdadera).	20
3.5.2	Epítopes de IgE	21
4.	ANTECEDENTES	23
5.	OBJETIVOS	31
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	32
6.1	Reactivos	32
6.2	Soluciones	33



6.3	Muestras	34
6.4	Estrategia experimental	36
6.5	Obtención de aislados proteicos	39
6.6	Composición proximal	39
6.7	Solubilidad de proteínas a distintos valores de pH.	39
6.8	Solubilidad de proteínas en distintos solventes.	40
6.9	Identificación de las proteínas mediante geles de poliacrilamida Tris-Glicina-SDS (SS-PAGE) (12).	40
6.10	Identificación de las proteínas mediante geles de poliacrilamida Tris-Tricina-SDS (TSDS-PAGE) (22).	42
6.11	Cuantificación de proteínas por el método de Bradford (3).	43
6.12	Cuantificación de proteína por el método de Lowry-SDS (15)	43
6.13	Transferencia a membranas de Polivinil Difluoruro (PVDF).	44
6.14	Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA) (Pet System Manual)	45
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
7.1	Obtención de aislados proteicos	46
7.2	Composición proximal de los aislados proteicos y harinas de ajonjolí	46
7.3	Comportamiento de solubilidad de proteínas en función del pH.	48
7.4	Perfil electroforético: proteínas de los aislados industriales y laboratorio.	50
7.5	Secuenciación de la proteína	56
7.6	Extracción de proteínas en distintos solventes	57
8.	CONCLUSIONES	61
	Anexo 1	62
	Anexo 2	64
	Anexo 3	66
	Anexo 4	67
9.	REFERENCIAS	68
9.1	Referencias en la Web	71



ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURA 3.1 Planta de ajonjolí (<i>Sesamum indicum</i> L.)	6
FIGURA 3.2 Proceso de obtención de concentrados proteicos	9
FIGURA 3.3 Diagrama de obtención de aislados proteicos	10
TABLA 3.1 Principales alérgenos de alimentos vegetales identificados a la fecha que han sido incluidos en la base de datos. Se observa a la albúmina 2S como alérgeno que sensibiliza vía tracto gastrointestinal (14).	17
FIGURA 3.4 Mecanismos de reacciones alérgicas mediadas por anticuerpos Ig-E.	22
FIGURA 4.1 Secuencia de aminoácidos del precursor de la albúmina 2S (α -Globulina). Número de acceso AF091841 (26).	24
FIGURA 4.2 Secuencia de aminoácidos del precursor de la globulina 11S (β -Globulina). Número de acceso AF091842 (26).	25
FIGURA 4.3 Secuencia de aminoácidos del precursor de la albúmina 2S. Número de acceso AF240005. (27).	26
FIGURA 4.4 Secuencia de aminoácidos de la proteína 2S albúmina identificada por Pastorello (2001) (15).	26
TABLA 4.1 Secuencias internas de cuatro proteínas identificadas como alérgicas.	26
FIGURA 4.5 Secuencia de péptidos obtenidos por digestión con Lys C.	28
TABLA 4.2 Secuencia de aminoácidos de 6 péptidos sintetizados que cubren la secuencia completa del péptido B (Albúmina 2S) obtenido mediante rompimiento con Lys C. El tamaño de cada péptido sintetizado es de 20 residuos de aminoácidos, difiriendo en 10 residuos de aminoácidos.	29
TABLA 4.3 Secuencia de aminoácidos que comparten los 9 péptidos sintetizados del péptido B de la albúmina 2S. Se presentan los tres péptidos considerados Inmunodominantes (>80% pacientes lo detectaron).	29
TABLA 4.4 Proteínas alérgicas presentes en semillas de ajonjolí.	30
FIGURA 6.1 Diagrama de obtención de aislados proteicos a nivel industrial por la empresa DIPASA.	35
TABLA 6.1 Código de las muestras utilizadas en la investigación.	36
FIGURA 6.2 Proceso de obtención de aislados proteicos a partir de <i>Sesamum indicum</i> cremoso Chiapas.	37
FIGURA 6.3 Estrategia experimental de identificación de la presencia de proteínas alérgicas en aislados proteicos.	38
TABLA 7.1 Composición de aislados industriales, laboratorio y de harinas de ajonjolí.	47
FIGURA 7.1 Curva de solubilidad de los aislados proteicos industriales.	49
FIGURA 7.2 Perfil proteico HA Chiapas. A) 100 μ g Proteína. B) 200 μ g Proteína.	51



FIGURA 7.3 Perfil Proteico HA-DIPASA. A) 200µg Proteína B) 100 µg Proteína.	52
FIGURA 7.4 Perfil proteico de los aislados industriales. A) Sesaprot ®.b) AP-PI.	53
FIGURA 7.5 Perfil proteico de los aislados proteicos a) L-UF y b) L-PI.	55
FIGURA 7.6 Péptidos obtenidos de secuenciación.	57
TABLA 7.2 Proteína de las fracciones obtenidas de la extracción secuencial. El factor de conversión utilizado 5.3. El valor mostrado es el resultado de 3 determinaciones.	58
FIGURA 7.7 Perfil electroforético, extracción secuencial de HA-Chiapas. Los solventes utilizados a) agua b) NaCl 0.5 m c) 1-propanol d) buffer de boratos	60
FIGURA 7.8 Perfil electroforético, extracción secuencial de L-UF. Los solventes utilizados a) agua b) NaCl 0.5 m c) 1-propanol d) Buffer de boratos.	60
ANEXO 3 - Tabla 1 Curva de solubilidad en función del pH de Sesaprot ®. En la tabla se muestra el porcentaje de proteína.	66
ANEXO 4 - Tabla 1 Curva de solubilidad en función del pH del AP-PI. En la tabla se muestra el porcentaje de proteína.	67



1. RESUMEN

El ajonjolí es una de las oleaginosas mas importantes en Asia y es cultivada también en México debido al aceite que se puede obtener de éstas, también es muy consumida como especia por su alto valor nutricional ya que es rica en metionina.

En la industria como subproducto del proceso de obtención de aceite de ajonjolí se obtiene una harina con un porcentaje de proteína alrededor del 45% y representa una fuente proteica para la obtención de aislados o concentrados proteicos. Actualmente la empresa DIPASA elabora un aislado proteico de ajonjolí a partir de una mezcla de variedades.

En los últimos años se han detectado casos sobre alergias alimentarias provocadas por el consumo de ajonjolí por lo que se han realizado investigaciones para caracterizar este tipo de alergenos. Se ha encontrado que el mayor alergeno es una proteína de reserva que pertenece a la familia de las albúminas, denominada por su coeficiente de sedimentación como la albúmina 2S con un peso aproximado de 14 kDa y 7 kDa cuando es hidrolizada por la asparaginil-endopeptidasa durante la maduración de las semillas.

El presente trabajo se fijó como objetivos detectar la presencia de estas proteínas en aislados comerciales fabricados por la empresa DIPASA y por aislados que se obtuvieron en el Laboratorio a partir de una semilla de ajonjolí de variedad conocida (*Sesamum indicum cremoso Chiapas*). Esta detección se realizó mediante electroforesis desnaturalizante en geles SDS-PAGE y TSDS-PAGE en donde se observaron proteínas con peso molecular similar al reportado de la albúmina 2S. Posteriormente se obtuvo la secuencia de estas bandas identificando estas proteínas como peptidos de la hidrólisis de la isoforma 4 de la globulina 11S y del precursor 2 de la globulina 11S, proteínas presentes en semillas de ajonjolí.



2. INTRODUCCIÓN

Las proteínas de las plantas desempeñan un papel importante en la alimentación, particularmente en países en desarrollo donde el consumo de proteínas de origen animal es menor que el requerido. Por tal motivo la industria alimentaria se encuentra en la búsqueda de proteínas alternativas que posean características nutritivas, sensoriales y funcionales adecuadas a los productos en los que se aplican. El éxito dependerá de factores tales como el precio, disponibilidad de proteína animal y la producción de nuevos alimentos, pero principalmente de sus propiedades funcionales así como de los aminoácidos esenciales que proporcionen.

En los últimos años se ha dado un cambio en cuanto al consumo de proteínas, una disminución en el consumo de proteínas de origen animal y un aumento en las de origen vegetal por su variedad, disponibilidad y costo, explotándose tanto las propiedades funcionales como los beneficios nutricionales. Las proteínas de origen vegetal se obtienen principalmente de semillas de leguminosas, cereales, oleaginosas y en baja proporción de hojas verdes.

La soya es la más utilizada y vendida en el mercado mundial de aditivos proteínicos, ya que es una de las leguminosas mejor estudiadas y de la cual se obtienen diferentes productos como hidrolizados, concentrados y aislados, los cuales se utilizan en productos como helados, queso, salchichas y varios más por la propiedades funcionales que presentan, además sus efectos benéficos a la salud.

De entre las oleaginosas, el ajonjolí representa una fuente proteica de importancia por su alto contenido en metionina el cual es aminoácido limitante en las dietas tropicales que son a base de legumbres, a diferencia de otras oleaginosas, la harina así como los aislados obtenidos a partir de ajonjolí no contienen pigmentos ni resabios amargos.

Para evaluar correctamente el potencial de una nueva fuente proteica es necesario llevar a cabo la determinación sistemática de las propiedades funcionales y nutrimentales tanto de la materia prima original, como de concentrados y aislados proteicos obtenidos de ésta, lo que permite evaluar y predecir su comportamiento en sistemas específicos.

Por otro lado para su comercialización mundial también se busca la presencia de alergenicos, ya que parte de la población sufre de alergias a ciertos alimentos. Una alergia alimenticia se define como una respuesta adversa inmune hacia proteínas de



los alimentos (alergenos) y afecta a más del 5% de los niños y del 2% de los adultos en el mundo. Alrededor de 10 alimentos son los responsables de la mayoría de las alergias, entre los que se incluyen algunos de origen vegetal como el cacahuate y la soya y otros de origen animal como la leche y huevo.

El creciente incremento de alergias causadas por ajonjolí en países asiáticos ha llamado la atención de la comunidad científica, quienes han realizado distintas investigaciones para caracterizar e identificar los alergenios específicos en ajonjolí, encontrando que el mayor alergenio es la albúmina 2S perteneciente a las proteínas de reserva de las semillas; es una proteína de 14 kDa formada por dos subunidades de ≈ 9 y ≈ 4 kDa.

El propósito de este trabajo es detectar la presencia de estas proteínas en aislados comerciales fabricados por la empresa DIPASA (Distribuidora Internacional de Productos Agrícolas S. A. de C. V.) a partir de la harina obtenida como subproducto de la extracción del aceite. Estos aislados fueron obtenidos por distintas metodologías de concentración (ultrafiltración y precipitación isoelectrica); así como en aislados obtenidos a nivel laboratorio a partir de una variedad de ajonjolí (*Sesamum indicum cremoso Chiapas*), concentrados por las mismas metodologías establecidas por la empresa.

Para la detección de las proteínas alergénicas se realizó en primer lugar una separación mediante electroforesis desnaturizante en geles de Tris-Tricina y Glicina; posteriormente las bandas seleccionadas de acuerdo al peso molecular se caracterizaron por secuenciación de las mismas.

Aunada a esta investigación se realizó la caracterización bioquímica de las proteínas de los aislados mediante extracciones con distintos solventes y mediante curvas de solubilidad en función del pH (2 -12).



3. MARCO TEÓRICO

3.1 Ajonjolí

3.1.1 Generalidades

El ajonjolí cuyo nombre científico es *Sesamum indicum* L. o *Sesamum orientale* L. es una de las 60 especies comprendidas dentro de la familia Pedaliaceae ⁽⁶⁾. Se considera que tuvo su origen en Etiopía y como regiones o países de diversificación secundaria fueron India, Japón y China ^(A).

El alto valor nutricional del ajonjolí se debe a la presencia de aminoácidos azufrados (metionina) y con excepción de los oxalatos en la cáscara y ácido fítico en la semilla no hay ningún otro agente tóxico, antinutricional o generador de color en el ajonjolí ^(20; 21). Aunque recientemente se han reportado casos sobre alergias debido al consumo de ajonjolí este representa apenas el 1% de los casos de alergias alimentarias.

La semilla de ajonjolí probablemente sea el condimento más antiguo utilizado por el hombre y quizá el primer cultivo generado para extraer aceite, en la antigua Babilonia se utilizaba para elaborar pasteles, vino y brandy; mientras que el aceite se usaba para cocinar y en productos de belleza, los egipcios la utilizaban con fines medicinales desde el año 1500 a.c y en los siglos XVII y XVIII los esclavos trajeron la semilla a América ⁽²⁰⁾.

3.1.2 Aspectos Botánicos

Es una planta anual herbácea cuyo ciclo puede variar entre 90-130 días dependiendo de la variedad y las condiciones ecológicas; se adapta de 0 – 600 metros sobre el nivel del mar, se caracteriza por soportar temperaturas que fluctúan entre 20 y 35 °C y requiere precipitaciones pluviales entre 400 y 900 mm. El tipo de suelo es de textura fresca o arenosa, con buen drenaje interno y externo. Se adapta a suelos con pH entre 5.5 a 7.5. Crece de uno a dos metros; su tallo es erecto, cilíndrico y cuadrangular y en algunos casos puede tener seis lados; el tamaño de sus hojas es de 3-17 cm. de largo y 5 cm. de ancho; su flor es de corola blanca o morada con cinco lóbulos por último el fruto consiste en una vaina elíptica de dos y



cuatro cámaras y cada una contiene 20 semillas aproximadamente, éstas miden entre 2.5-3.0 mm de longitud y aproximadamente 1.5 mm de ancho, dichas semillas son aplanadas, pequeñas, blancas, grises o negras en su exterior. (Figura 3.1) ^(A).

Hay diferentes variedades de ajonjolí las cuales se pueden distinguir por su color, las más comunes son de color blanco y negro o tostado. Las primeras se caracterizan por su buen desarrollo y por ser exigentes en nutrientes del suelo, por tanto se utilizan en panificación y repostería; la segunda variedad corresponde a las semillas mezcladas (coloraciones) entre amarillo a marrón oscuro (la más cultivada en México), esta planta es más pequeña con menores rendimientos, se desarrolla en suelos pobres en nutrientes y se utiliza en la producción de aceites y harinas ^(A).

3.1.3 Composición

La semilla contiene aceite (50-54%), proteína (25%), carbohidratos (11%), cenizas (5%), fibra (4%) y agua (5%) la cáscara comprende alrededor del 17% de la semilla y está compuesta principalmente por fibra. Al extraer el aceite de la semilla se obtiene una harina con un contenido proteico entre 45 - 50% ⁽¹¹⁾.

3.1.4 Usos

El principal uso de la semilla de ajonjolí es la obtención de aceite, el cual es muy apreciado debido a que posee un sabor agradable además de que es uno de los más fácilmente digeridos por el sistema gastrointestinal humano y contiene compuestos como Sesamina y Sesamol con propiedades antioxidantes. Compuesto aproximadamente de un 43% de ácido oleico y 43% de ácido linoleico, es uno de los pocos aceites vegetales que no requieren de un proceso de refinación previo a su consumo ⁽¹¹⁾. Cuando a las semillas se les elimina la cutícula se emplean para comerse directamente, en México es utilizada como especia en la preparación de pan, galletas, confitería y entre otros usos en la fabricación de jabones, cosméticos y pinturas. En África el ajonjolí es empleado para hacer sopas y confitería ⁽²⁰⁾, mientras que en algunas regiones de Asia es utilizado en la elaboración de alimentos tradicionales y particulares como el halvah, halawa y tahini ⁽¹⁹⁾. Después de la extracción del aceite, la parte residual (torta o pasta) contiene 45 -50% (p/p) de proteína y 10-20% de aceite remanente, la cual se utiliza para alimentación del ganado y aves de corral ^(A).



Figura 3.1 Planta de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.)

3.1.5 Proteínas del ajonjolí

El ajonjolí ha sido uno de los cultivos más importantes en Asia debido al aceite que se puede obtener de esta semilla, sin embargo también es muy consumida con especia por su alto valor nutricional, ya que es rica en metionina. Contiene aproximadamente 50% de aceite y 20% de proteína donde la más abundante es la globulina 11S la cual es insoluble y constituye 60-70% del total de las proteínas de la semilla, se le ha denominado α -globulina. En contraparte la proteína soluble mas abundante en la semilla es la albúmina 2S que constituye aproximadamente el 25% del total de las proteínas, se le ha denominado β -globulina ⁽²⁶⁾.



3.2 Aislados proteicos

Las proteínas plantas desempeñan un papel importante en la nutrición humana, particularmente en países en desarrollo en los cuales el consumo de proteínas de origen animal es menor que el requerido; y por otro lado en la elaboración de productos alimenticios debido a las propiedades funcionales que imparten.

La industria alimentaria se ha dado a la tarea de obtener proteínas de diversas fuentes ya sea de leguminosas, cereales y oleaginosas. La forma más común de comercializar estas fuentes proteicas es la producción de concentrados y aislados que tienen diversas aplicaciones como ingredientes o aditivos alimentarios y cuyas propiedades dependen del tipo y número de proteínas presentes así como de su pureza.

Un aislado proteínico se define como la porción principalmente proteínica, obtenida de granos limpios, sanos y de alta calidad por medio de la remoción de los componentes no proteínicos hasta llegar a un 90% de proteína en base seca ⁽²³⁾.

Entre los aislados proteicos vegetales más comercializados se encuentran principalmente los de soya, aunque también existen ya otras opciones como los de canola, trigo, chícharo, almendras ⁽¹⁸⁾ y ajonjolí. Actualmente en México la empresa Distribuidora Internacional de Productos Agrícolas S. A. de C. V. (DIPASA) produce un aislado proteico de ajonjolí, Sesaprot ®, el cual cubre las necesidades proteicas para la población adulta y otros grupos que necesitan dietas específicas, como las mujeres embarazadas ⁽¹³⁾.

3.2.1 Métodos de obtención

Para la fabricación de aislados o concentrados proteicos, es preciso romper el arreglo interno ordenado de la células, para separar adecuadamente los diferentes constituyentes; cada uno de estos derivados tiene ciertas características y propiedades funcionales que pueden aprovecharse en la producción de otros alimentos mas complejos y elaborados.

En la elaboración de estos productos se parte de la harina parcial o totalmente desgrasada, en forma de gránulos, hojuelas o polvo; contienen un mínimo de 40% de proteína, y durante su manufactura se someten a un calentamiento con vapor para eliminar el residuo del disolvente usado para la extracción de aceite, y en el



caso de soya por dar un ejemplo, se somete a un tostado para inactivar la lipoxigenasa, los inhibidores de tripsina y otros factores antifisiológicos.

Los concentrados son productos mas refinados que las harinas, y contienen un mínimo de 65% de proteína, en su manufactura se elimina menos de la mitad de los hidratos de carbono de la harina, además de otros componentes de menor importancia.

Para su elaboración se pueden seguir tres diferentes procesos (*Figura 3.2*); el primero utiliza una solución de etanol al 80% para quitar ciertas fracciones solubles como son los oligosacáridos, parte de las cenizas y otras sustancias de peso molecular bajo; en estas condiciones, las proteínas y los polisacáridos precipitan debido a que son insolubles en alcohol y se pueden recuperar sometiéndolas a una desolventización para obtener un concentrado proteico como residuo final. El segundo proceso implica una extracción de las proteínas en su punto isoeléctrico en el que las globulinas y los polisacáridos se insolubilizan y precipitan, y posteriormente se neutralizan y se secan. El tercer método utiliza calor húmedo para desnaturalizar e insolubilizar los polipéptidos de la harina, seguido de un lavado con agua para eliminar los azúcares y otras moléculas pequeñas.

Los concentrados obtenidos mediante estos tres procesos tienen aproximadamente la misma composición sin embargo, las propiedades físicas y funcionales son diferentes en cada caso. En general, tienen un sabor y un olor menos intenso que la harina, ya que durante las etapas de manufactura se eliminan algunos de los compuestos responsables del sabor ⁽¹⁾.

Los aislados son la forma comercial más purificada de las proteínas, ya que contienen 90% o más de ellas; se logran eliminando de los concentrados los polisacáridos, los oligosacáridos residuales y algunos otros componentes. El proceso de aislamiento se basa en las diferencias de solubilidad de las fracciones globulinicas con respecto al pH; para su obtención se parte de harinas desgrasadas que han recibido un tratamiento térmico mínimo, y la extracción se efectúa con una disolución acuosa de hidróxido de sodio a 60°C y pH 9 – 11 (*Figura 3.3*); el residuo insoluble contiene principalmente polisacáridos que se eliminan por centrifugación. El extracto se acidifica a pH 4.5, lo que hace precipitar la mayor parte de la proteína en forma de crema, que se separa del suero (fracción soluble) por centrifugación; posteriormente se lava y se neutraliza con hidróxido de sodio para resolubilizarla y, por último, se seca por aspersión; así se obtiene un proteínato de sodio que es más



soluble en agua que la proteína en su punto isoelectrico; por otro lado las proteínas se pueden recuperar por ultrafiltración.

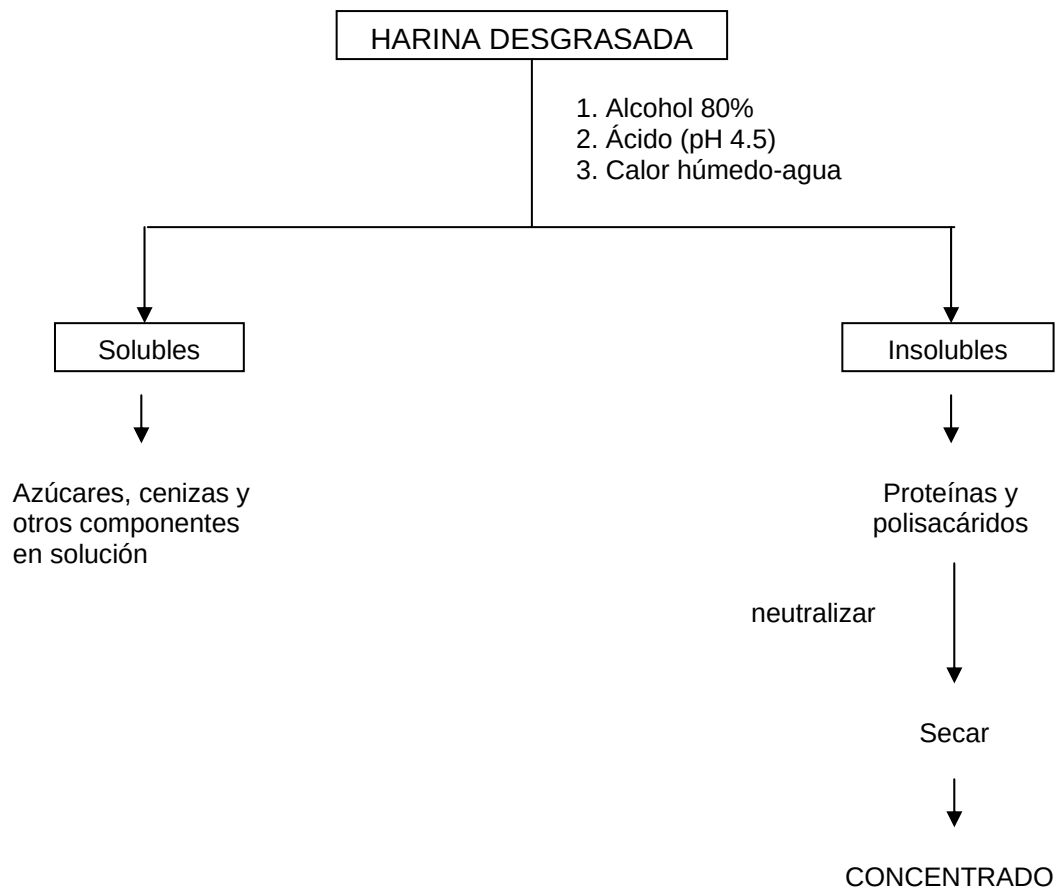


Figura 3.2 Proceso de obtención de concentrados proteicos

Los aislados todavía contienen ciertos compuestos de bajo peso molecular como saponinas, fosfolípidos, isoflavonas y algunos glucósidos. Al igual que sucede con los concentrados, los diferentes aislados comerciales tienen aproximadamente la misma composición química; sin embargo sus propiedades físicas y funcionales pueden variar.

El proceso de aislamiento de proteínas en cada uno de los procesos de obtención de concentrados o aislados, se basa como ya se mencionó anteriormente, en las diferencias de solubilidad de las fracciones proteicas respecto a ciertos factores como lo son el pH y temperatura.

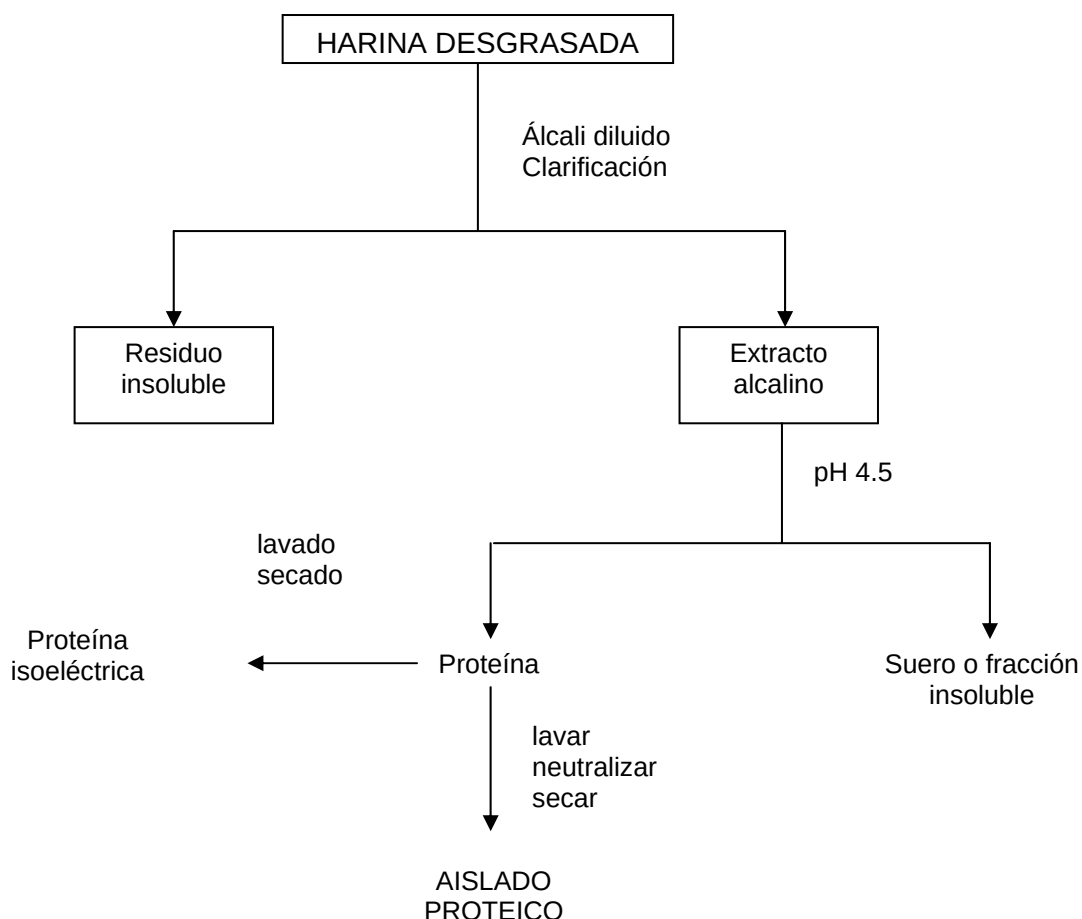


Figura 3.3 Diagrama de obtención de aislados proteicos

3.2.1.1 Solubilidad de las proteínas.

La solubilidad de una proteína es la manifestación termodinámica del equilibrio entre interacciones proteína-proteína y proteína-disolvente. La disolución ocurre por la dispersión de las moléculas de proteína en el disolvente, se relaciona con cambios en las interacciones de los residuos hidrofóbicos e hidrofílicos sobre la superficie de la proteína con el disolvente. Se presentan numerosas interacciones ya sea por puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo e interacciones iónicas. La disolución está directamente relacionada con la naturaleza fisicoquímica de la superficie de la proteína, la cual a su vez es influenciada por el patrón de plegamiento de la cadena polipeptídica.

La solubilidad depende principalmente del pH, fuerza iónica, tipo de disolvente y temperatura, presentando la mínima solubilidad a su pH isoelectrico; pH donde la carga neta de la molécula será igual a cero. La solubilidad de la mayoría de las proteínas se ve afectada también por la desnaturalización por calor, debido a la



alteración del balance de las interacciones proteína-proteína y proteína-disolvente. La proporción de residuos hidrofóbicos expuestos sobre la superficie de una proteína influye en su estabilidad termodinámica; aunque todas las proteínas sufren desnaturalización térmica, aquellas con mayor cantidad de estos residuos expuestos sobre su superficie, serán más susceptibles a este fenómeno.

Las características de solubilidad son útiles para la determinación de las condiciones de extracción y purificación óptimas a partir de fuentes naturales. La disolución indica, en buena medida, las aplicaciones potenciales de la proteína debido al grado de no disolución o la cantidad de proteína precipitada, y es el índice mas práctico que refleja tanto la desnaturalización proteínica, como la agregación de proteínas. Por otro lado, la solubilidad casi siempre se ve reducida irreversiblemente, cuando se involucra calentamiento ⁽³⁰⁾. Por último, los valores de proteína soluble a los diferentes pH son indicadores del estado de un aislado proteínico y permiten proponer el sistema alimenticio al que se puede incorporar.

3.2.1.2 Influencia del pH

Al someter una proteína en una disolución variando los valores de pH, ya sean superiores o inferiores al punto isoeléctrico la proteína tendrá carga negativa o positiva y las moléculas de agua interaccionan con estas cargas contribuyendo así a su solubilización. Si se representan en función del pH las variaciones de la solubilidad de una proteína determinada, se obtiene una curva en V o en U en las que el mínimo corresponde al pI (punto isoeléctrico) en este punto no es que la proteína no tenga carga, sino que las cargas positivas igualan a las negativas en la superficie. Algunas proteínas alimentarias son altamente solubles en su pH isoeléctrico, porque no hay repulsión electrostática y contienen una alta concentración de residuos hidrofílicos en su superficie comparados con los no polares por lo que la proteína permanecerá soluble en su pI.

Muchas proteínas son altamente solubles a pH alcalino (8-9), al que normalmente se lleva a cabo la extracción de proteínas de fuentes vegetales, como sucede en la producción de aislados de soya, ajonjolí u otras leguminosas. La proteína se recupera del extracto por precipitación isoeléctrica en el rango de pH de 4.5 – 4.8. El comportamiento ante el pH cambia si la proteína se trata térmicamente como consecuencia de la desnaturalización debido al cambio de hidrofobicidad superficial



por el desplegamiento, lo que acarrea un incremento en las interacciones proteína – proteína ⁽¹⁾.

3.2.1.3 Influencia de la fuerza iónica

La solubilidad disminuye para las proteínas que contienen una alta incidencia de zonas no polares y se incrementa para las proteínas que no. El descenso en la solubilidad es causado porque se incrementan las interacciones hidrofóbicas, en tanto la mayor solubilidad se debe a un descenso en la actividad iónica de la molécula. El efecto depende no sólo de la concentración de las sales, sino del tipo de las mismas: las sales de sulfato y fluoruro bajan progresivamente la solubilidad (salting-out) mientras que las sales de tiocianato y perclorato incrementan la solubilidad (salting-in) ⁽¹⁾.

3.2.1.4 Influencia de la temperatura

La solubilidad de muchas proteínas generalmente se incrementa a temperaturas entre 0 y 40 °C, siempre y cuando se tenga un pH y una fuerza iónica constante. Se presentan excepciones cuando las proteínas son altamente hidrofóbicas (proteínas de cereales), las cuales presentan relaciones negativas con temperaturas arriba de los 40 °C. El aumento de la energía térmica causa desplegamiento de las proteínas, ya que los grupos no polares son expuestos, por lo que se da la agregación y precipitación de las proteínas disminuyendo la solubilidad ⁽¹⁾.

3.2.1.5 Clasificación de las proteínas en función de su solubilidad.

Osborne en 1907 clasificó las proteínas según su solubilidad. Así es posible describir las albúminas (seroalbúminas, ovoalbúmina, α -lactoalbúmina) como solubles en agua a pH 6.6; las globulinas (β -lactoglobulina) solubles en soluciones salinas diluidas a pH 7; las prolaminas (zeína, gliadinas) solubles en el etanol al 70%, las glutelinas (glutelinas de trigo) insolubles en los disolventes mencionados anteriormente, pero solubles en los ácidos (pH 2) o bases (pH 12) ⁽⁵⁾.

3.3 Proteínas de reserva.

3.3.1 Generalidades

Las semillas no sólo son órganos de propagación y dispersión sino también el tejido vegetal más cultivado por la humanidad. La cantidad de proteína en peso seco de



las semillas varía desde el 10%, en cereales hasta 40% en ciertas leguminosas y oleaginosas, lo que las constituye en una fuente primordial de proteína en la dieta. Aunque la gran mayoría de las proteínas individuales presentes en las semillas maduras tienen una función metabólica o estructural, las semillas también contienen uno o más grupos de proteínas presentes en gran cantidad y que sirven a modo de reserva de aminoácidos para ser usados durante la germinación y el crecimiento de la plántula. Estas proteínas de reserva son de particular importancia debido a que determinan no sólo el contenido total de proteína sino también su calidad para diversos usos finales. Por ejemplo, el bajo contenido de lisina, treonina y triptofano en varias gramíneas así como de cisteína y metionina en leguminosas se debe a la baja proporción de estos aminoácidos en las principales proteínas de reserva y son factores que pueden limitar la calidad nutricia de estas semillas para animales monogástricos. En el caso del trigo, las proteínas de reserva conforman el gluten, cuyas propiedades son responsables en gran medida de la posibilidad de usar harina de trigo para elaboración de pan, otros productos horneados y pastas. Estas propiedades no se observan en las proteínas de reserva de otros cereales.

3.3.2 Características de las proteínas de reserva de la semilla.

A pesar de la extensa variedad en los detalles de su estructura, todas las proteínas de reserva de la semilla tienen ciertas propiedades comunes. En primer lugar, son sintetizadas en grandes cantidades en tejidos específicos y en ciertas etapas del desarrollo. De hecho, su síntesis está regulada por la nutrición y pueden actuar como un reservorio de nitrógeno adicional. Sin embargo, la mayoría también contiene cisteína y metionina, por lo que es necesaria una fuente adecuada de azufre para su síntesis. Muchas semillas contienen grupos separados de proteínas de reserva, algunos de los cuales son ricos en aminoácidos azufrados y otros que son deficientes en ellos. La presencia de estos grupos permitiría a la planta mantener la síntesis de proteínas de reserva a niveles elevados a pesar de las variaciones en la disponibilidad de azufre. Una segunda propiedad de todas las proteínas de reserva es su presencia en la semilla madura en depósitos llamados cuerpos proteicos y que de hecho varían entre especies y aún dentro de una misma especie. Finalmente todas las fracciones de proteína de reserva son mezclas de componentes que exhiben polimorfismo, tanto dentro de genotipos individuales como entre genotipos de la misma especie. Este polimorfismo surge de la presencia



de familias multigenéticas y en algunos casos de procesos proteolíticos y de glicosilación.

3.3.3 Proteínas de reserva de la familia de las albúminas.

Las proteínas que pertenecen a esta familia conforman los alérgenos más importantes del trigo y otros cereales como el arroz ⁽¹⁵⁾.

Las albúminas 2S fueron inicialmente definidas como grupo en base a sus coeficientes de sedimentación (S_{20w}) de alrededor de 2. Están ampliamente distribuidas entre las dicotiledóneas y han sido ampliamente estudiadas en las crucíferas, especialmente en la canola (donde reciben el nombre de napinas) y en *Arabidopsis*. Las napinas están formadas por dos cadenas polipeptídicas con valores de pesos moleculares entre 9000 y 4000 Da unidas mediante puentes disulfuro. Son sintetizadas como una sola proteína precursora que es cortada proteolíticamente, perdiendo un fragmento peptídico de unión y péptidos cortos tanto en el extremo carboxilo como amino. Esta parece ser la estructura típica de las albúminas 2S: se pueden encontrar proteínas heterodímeras similares en especies tan distintas como la calabaza, el algodón, el ricino y los lupinos.

A pesar de las variaciones en la estructura y síntesis de sus subunidades, todas las albúminas 2S son proteínas globulares compactas con residuos de cisteína bien conservados. Si bien poco se sabe de los detalles de la estructura tridimensional de las albúminas 2S, se ha reportado que la semilla de mostaza amarilla contiene cerca de 50% de hélice alfa, con poca o ninguna hoja β -plegada. Shewry et al. (1995) sugieren una estructura anular con alfa hélices fuertemente empaçadas del mismo modo que se propone para las zeínas, pero no hay evidencias experimentales que apoyen esta estructura ⁽²⁴⁾.

3.3.4 Proteínas de reserva de la familia de prolaminas.

Las proteínas de reserva de los tipos de albúminas y globulinas 2S están ampliamente distribuidas entre las angiospermas (plantas con flor), en tanto que las del tipo de prolaminas están restringidas a los pastos (gimnospermas), grupo que incluye a los cereales, en los cuales las prolaminas usualmente constituyen hasta la mitad del nitrógeno total del grano. Las excepciones más notables a esta regla son el arroz y la avena, cuyas principales proteínas de reserva son del tipo de las



globulinas 11S y que contienen bajos niveles de prolaminas (de 5 a 10% del total de proteína del grano).

Se consideran típicamente como prolaminas al grupo de proteínas solubles en mezclas de alcohol-agua (normalmente entre 60 y 70% de etanol o 50% de propanol) y que contienen altos niveles de glutamina y prolina. Sin embargo, la comparación en las secuencias primarias de aminoácidos han demostrado que esta definición debería ampliarse para incluir componentes que son insolubles en soluciones acuosas de alcohol en el estado nativo debido a la presencia de uniones disulfuro entre cadenas y reconocer, en cambio, que todas las prolaminas, aún estas fracciones insolubles, están relacionadas mutuamente, excepto por las alfa zeínas del maíz y sus homólogos presentes en cereales "Panicoid" emparentados. Salvo esta excepción, todas las prolaminas deberían agruparse en un único grupo o superfamilia de prolaminas.

3.3.5 Proteínas de reserva de la familia de las globulinas.

Las globulinas son el grupo de proteínas de reserva más ampliamente distribuido, presentes no sólo en dicotiledóneas sino también en monocotiledóneas (incluyendo los cereales y las palmeras) y en esporas de helecho. Pueden dividirse en dos grupos, según sus coeficientes de sedimentación: las globulinas tipo 7S-vicilina y las tipo 11S-legumina. Ambos grupos exhiben considerables variaciones en sus estructuras, que derivan parcialmente de procesos post-traduccionales. Además, ambos tienen significancia nutricional en tanto que son deficientes en aminoácidos azufrados, si bien las globulinas 11S generalmente contienen niveles ligeramente más altos de estos aminoácidos en comparación con otras proteínas. Las proteínas de reserva del tipo de las globulinas se han estudiado al detalle en leguminosas, notoriamente en chícharos, soya, "haba ancha" y frijol común (*Phaseolus vulgaris*).

Las proteínas de reserva del tipo 11S-legumina son las mas abundantes no solo en las leguminosas también en las dicotiledóneas y en algunos cereales. La proteína madura esta formada por seis pares de subunidades que se unen por enlaces no covalentes. Cada una de estas subunidades esta formada por una subunidad ácida con peso molecular de 40,000 y una subunidad básica con peso molecular de 20,000, unidas por puentes disulfuro. Cada par de subunidades es sintetizada como una proteína precursora cortada proteolíticamente después de la formación de los puentes disulfuro.



El tipo de proteínas de las globulinas-7S son triméricas con pesos moleculares alrededor de 150,000 a 190,000 pobres en residuos de cisteína por lo que no forman uniones disulfuro ⁽²⁴⁾.

3.3.6 Proteínas de reserva de la familia de las glutelinas

Son proteínas de alto peso molecular y poseen cadenas ramificadas y junto con la gliadina constituyen el gluten, formando una fracción proteica insoluble que da elasticidad a la masa de panificación.

Las prolaminas y las glutelinas constituyen la fracción mayoritaria (80 – 90%) de la proteína del grano. Su localización preferentemente en el endospermo del grano (proteína de reserva) tiende hacerlas mas accesibles a la hidrólisis enzimática.

3.4 Familias de proteínas alergénicas en alimentos vegetales

Los tejidos vegetales, incluyendo aquellos que el hombre consume, contiene un número inmenso de proteínas, muchas de la cuales se encuentran en cantidades mínimas o sólo temporalmente. Por ejemplo, el análisis molecular revela que son entre 4500 y 8000 genes los que se expresan en el grano de trigo en desarrollo pero sólo se han identificado unas 1700 proteínas mediante electroforesis bidimensional, la tajante complejidad de esta mezcla hace difícil aislar y caracterizar poco más que un reducido número de componentes (aquellos presentes en mayor cantidad o que tienen propiedades funcionales o biológicas importantes). Sin embargo, en los últimos años se ha visto una explosión en la cantidad de información disponible, debido al secuenciamiento de genoma a gran escala (de la especie crucífera “modelo”, Arabidopsis) y al secuenciamiento más enfocado de ARNm individual de tejidos específicos. El desarrollo de poderosos métodos computarizados para comparar la secuencia de aminoácidos y la estructura de las proteínas nos ha permitido explotar esta información para determinar las relaciones estructurales y evolutivas de las proteínas vegetales, incluyendo alérgenos mayores.

Se ha elaborado una base de datos con información de los alérgenos de alimentos vegetales (*Tabla 3.1*). Los alérgenos incluidos se apegan a los siguientes criterios: se define un alérgeno vegetal como un antígeno que provoca una respuesta mediada por IgE (Inmunoglobulina-E) y como una proteína hacia la cual el 50% o más de un grupo de al menos 10 alérgicos separados han desarrollado una respuesta mediada por IgE ⁽¹⁴⁾.



Tabla 3.1 Principales alérgenos de alimentos vegetales identificados a la fecha que han sido incluidos en la base de datos. Se observa a la albúmina 2S como alérgeno que sensibiliza vía tracto gastrointestinal ⁽¹⁴⁾.

Tabla 3.1 Propiedades de los principales alérgenos en alimentos vegetales			
Alérgeno	Designación	Peso molecular (Da)	Propiedad y estabilidad
Alérgenos alimenticios de reacción cruzada (sensibilización por inhalación de alérgeno)			
Homólogos de alérgeno de polen Bet v1	Manzana (Mal d 1) Chabacano (Pru ar 1) Cereza (Pru av 1), Pera (Pyr c 1), Zanahoria (Dau c 1) Apio (Api g 1), Avellana (Cor a 1.0401)	16,000-17,700	Función desconocida, miembro de las proteínas antipatógenas PR-10
Profilinas	Cereza (Pru av 4) Pera (Pyr c 4) Cacahuete (Ara h 5) Soya (Gly m 3), apio (Api g 4)	14,300-15,000	Proteína de unión a actina
Proteínas similares a la taumatina	Manzana (Mal d 2) Cereza (Pru av 2)	33,500	Causan lisis celular mediante unión a proteínas de membrana; miembros de las proteínas antipatógenas Pr-5
Isoflavona reductasa	Pera (Pyr c 5)	32,000	Enzima involucrada en el metabolismo vegetal secundario
Cisteín proteasa	Kiwi (Act c 1)	30-34,000	Aspartil proteasa
Quitinasa clase II	Aguacate (Prs a 1) Plátano (Mus p1.1, Mus p1.2) Rábano (Bra r 2) Castaña (Cas s 1)		Enzima que degrada la quitina de la pared de hongos y pertenece a las proteínas antipatógenas PR-3
Alérgenos que sensibilizan vía el tracto gastrointestinal: superfamilia de prolaminas			
Prolaminas de cereales	Gliadinas, gluteninas	30-55,000	Proteínas de semillas de reserva
Inhibidores de la alfa amilasa	Cebada (Hor v 1) Arroz (RAP) Centeno (Sec c 1) Trigo	15-16,000	Inhibidores de amilasas fúngicas y de insectos y por tanto, tienen un papel protector contra ataques patógenos
Proteínas no específicas de transferencia de lípidos	Manzana (Mal d 3) Chabacano (Pru ar 3) Ciruela (Pru d 3) Durazno (Pru p 3) Maíz (Zea m 14)	9,000	Se cree que participan en el transporte de monómeros de suberina durante la biosíntesis de cutina.
2S albúminas	Nuez de Brasil (Ber e 1), Cacahuete (Ara h 2,6,7), nuez de Castilla (Jug r 1), ricino (Ric c 1), mostaza amarilla (Sin a 1), mostaza oriental (Bra j 1), semilla de ajonjolí (Ses i 1)	9,000-17,000 (precursores frecuentemente procesados en subunidades pequeñas de 3000 y mayores de >9000)	Proteínas de semillas de reserva
Alérgenos de la Superfamilia de cupinas			
11S globulinas	Araquina de cacahuete (Ara h 3,4), glicinina de soya	50-60,000, precursor cortado postranscripcionalmente en subunidades unidas por disulfuros de 20,000 y 30-40,000 ensambladas en hexámeros	Proteínas de semillas de reserva
7S globulinas	Cacahuete (Ara h 1), nuez de Castilla (Jug r 2), conglucina de soya, lenteja	Subunidades de 50-70,000, a veces glicosiladas, ensambladas en trímeros	Proteínas de semillas de reserva



Se acordó que el mínimo de criterios para la inclusión de un alérgeno en este catálogo era:

- Conocer su peso molecular.
- Evidencia de una reacción alérgica asociada en al menos 3 pacientes, preferiblemente establecida mediante un ensayo controlado doble ciego con el alimento o una descripción convincente de una reacción anafiláctica al alimento en cuestión.

3.4.1 Superfamilia de prolaminas

La superfamilia de prolaminas comprende 3 grupos principales de alérgenos de alimentos vegetales, las albúminas 2S, las proteínas de transferencia no específica de lípidos (nsLTPs) y los inhibidores de tripsina y alfa amilasa de los cereales. Todas estas proteínas de bajo peso molecular son ricas en cisteína, tienen un plegamiento tridimensional similar abundante en hélices alfa y son estables frente a procesos térmicos y a la proteólisis. Las albúminas 2S son un grupo mayor de proteínas de reserva en muchas plantas dicotiledóneas. En este grupo se ubican alérgenos mayores de árboles de nuez y semilleros como la nuez de Brasil, la castaña, el ajonjolí y la mostaza. Los nsLTPs ejercen una importante contribución a las defensas vegetales contra hongos y bacterias. Están ampliamente distribuidos en frutas, nueces, semillas y vegetales y han suscitado mucho interés por ser alérgenos muy importantes, casi exclusivos para poblaciones atópicas mediterráneas. La familia de inhibidores de tripsina y de alfa amilasa en cereales, confiere cierto grado de resistencia contra insectos que se alimentan de los tejidos vegetales. Esta familia proteica incluye miembros alergénicos encontrados en el trigo, la cebada, el arroz y el maíz. Así como las albúminas 2S y los nsLTPs, las proteínas de esta familia son capaces de sensibilizar a individuos atópicos susceptibles mediante ingestión o inhalación.

3.4.2 Superfamilia de cupinas

Las cupinas son una superfamilia muy diversa en funcionalidad, cuyos miembros comparten un núcleo estructural de barril beta, del cual deriva su nombre (cupa=barril, en latín). La superfamilia de cupinas incluye las principales globulinas de reserva, principalmente de leguminosas y nueces. Las globulinas se dividen en tipo 7S vicilinas y tipo 11S leguminas. Se ha visto que las globulinas son alérgenos



altamente relevantes en alimentos vegetales como los cacahuates, la soya, la lenteja, la castaña, la avellana y el **ajonjolí**. A pesar de tener niveles muy bajos de identidad de secuencia, los miembros de la superfamilia de cupinas tienen estructuras altamente conservadas. A diferencia de la familia de alérgenos vegetales Bet v1, hay poca evidencia respecto a reactividad cruzada con IgE entre las cupinas alergénicas, con una identidad de secuencia global inferior al 40%. Esto resulta en una reactividad cruzada muy limitada entre las cupinas, incluso entre especies muy emparentadas como el cacahuete y el chícharo.

3.4.3 Familia Bet v1

Las personas con alergia al polen frecuentemente sufren de síntomas alérgicos luego de consumir ciertos alimentos. La mayoría de estas reacciones son causados por alérgenos de las frutas de la familia Rosaceae (manzana, cereza, chabacano, pera) y Apiaceae (apio, zanahoria), que reaccionan de forma cruzada con alérgenos presentes en el polen, particularmente con el alérgeno mayor del polen, Bet v1. Bet v1 fue el primero de muchos alérgenos reportados que mostraron homología con la familia 10 de proteínas asociadas a la patogénesis. Los alérgenos tipo Bet v1 tienden a ser inestables al calentamiento y a la digestión. En consecuencia, los síntomas se restringen a la cavidad bucal. En general, el Bet v1 del polen actúa como un agente sensibilizador primario. Los altos niveles globales de residuos superficiales conservados entre los miembros de la familia Bet v1 juegan un importante papel en la conservación de epítopes de unión a IgE y son la base de los síndromes de reactividad cruzada entre el polen y los frutos mencionados ⁽⁴⁾.

3.5 Alergias alimentarias

Se define como reacción adversa alimentaria a cualquier reacción no dirigida posterior a la ingesta de un alimento. Hay muchas clases de reacciones adversas alimentarias. Estas reacciones adversas pueden tomarse en un amplio sentido como “sensibilidad alimentaria” (reacciones reproducibles e incómodas a alimentos o ingredientes específicos).

Las sensibilidades alimentarias pueden dividirse en primarias y secundarias. La sensibilidad alimentaria primaria se divide a su vez en reacciones inmunológicas (que involucran al sistema inmunitario) y no inmunológicas. Existen otros tipos de reacciones inmunológicas a los alimentos que no involucran sistemas específicos de



anticuerpos, como la enfermedad celíaca, en la cual los enfermos son sensibles al gluten del trigo y otros cereales como centeno, cebada y avena.

Las reacciones no inmunes incluyen reacciones metabólicas, anafilactoides, intoxicaciones tipo alergia e idiosincrasias alimentarias. Los desórdenes metabólicos frecuentemente tienen un trasfondo genético hereditario. Una muestra es la deficiencia de la enzima lactasa, que deriva en una incapacidad de digerir lactosa, los individuos con intolerancia a la lactosa experimentan náusea, flatulencia y diarrea si consumen productos que contengan leche.

Las reacciones anafilactoides son respuestas inducidas por componentes de los alimentos que producen síntomas similares a los de una alergia, pero sin activar el sistema inmunitario que usualmente es el responsable de las alergias a alimentos. Estas reacciones pueden ser muy similares a las inmunológicas. Las fresas, los crustáceos y el chocolate son algunos de los alimentos que se reporta que tienen propiedades capaces de causar dichas reacciones.

Otro síndrome similar a una alergia es el envenenamiento por histamina, también referido como “envenenamiento con peces escómbridos”, ya que los alimentos causantes son frecuentemente, pero no siempre, pescados echados a perder de la familia de los escómbridos. La intoxicación con histamina se produce cuando las bacterias metabolizan la histidina presente en el pez en descomposición y la transforman en histamina, lo cual eleva la concentración de esta y promueve síntomas parecidos a una alergia.

Las idiosincrasias alimentarias son aquellas reacciones no inmunológicas a los alimentos cuyo mecanismo se desconoce, tales como el síndrome del restaurante chino y las migrañas asociadas a alimentos. Esta categoría también incluye padecimientos psicosomáticos.

Las sensibilidades alimentarias secundarias son reacciones adversas a los alimentos que ocurren a consecuencia de otras condiciones. Por ejemplo, la intolerancia a la lactosa que ocurre como consecuencia de un trastorno gastrointestinal ⁽⁸⁾.

3.5.1 Reacciones inmunológicas (Alergia alimentaria verdadera).

Una alergia es una reacción hipersensitiva en la cual los síntomas aparecen rápidamente debido a la exposición a macromoléculas generalmente proteínas, conocidos como antígenos o alérgenos ⁽⁵⁾.



Las reacciones alérgicas a alimentos constituyen sólo una pequeña parte de las sensibilidades alimentarias. En algunos individuos ciertos componentes de los alimentos, los alérgenos, son ingeridos y pasan a través del epitelio intestinal y llegan a la sangre, como para todas las personas, pero su sistema inmune reacciona a estos alérgenos alimentarios produciendo inmunoglobulinas-E (IgE), uno de los 5 sistemas de anticuerpos que nuestro cuerpo usa para combatir infecciones y protegerse de las enfermedades.

Las IgE son producidas por ciertas células llamadas células B y reconocen específicamente al alérgeno alimentario. Las moléculas de IgE son segregadas por la célula B y se conducen al sistema circulatorio, hasta alcanzar a los mastocitos. Estos están presentes en muchos tejidos del cuerpo, incluyendo el tracto respiratorio, el gastrointestinal y la piel. Existen células parecidas, los basófilos, en la sangre. Cuando las IgE alcanzan los basófilos o mastocitos, estos las atrapan y se aprovisionan de más moléculas de IgE. Cuando el alérgeno es consumido nuevamente y circula en la sangre, entra en contacto con las IgE unidas a la superficie del basófilo o mastocito. Las IgE reconocen al alérgeno y se ligan a él, con lo cual se entrecruzan con otras IgE. Este entrecruzamiento desencadena una cascada de eventos bioquímicos en la superficie de la célula que en última instancia deriva en la liberación de histamina y otras sustancias del mastocito. Estas sustancias son responsables de los síntomas de alergia. El mecanismo es exactamente el mismo para reacciones alérgicas a agentes ambientales distintos, como polen, pelo de animal, fármacos (por ejemplo, la penicilina) y venenos de insectos (por ejemplo, picaduras de abeja) ⁽⁸⁾.

3.5.2 Epítopes de IgE

Los sitios de una proteína que son reconocidos por un anticuerpo se conocen como epítopes. Se han identificado dos formas distintas de epítopes, lineales y conformacionales. En el caso de los epítopes lineales sólo influye la secuencia primaria de un polipéptido en su unión al anticuerpo, pero los epítopes conformacionales están formados por cierta cantidad de segmentos de la cadena polipeptídica (mismos que pueden estar bastante separados dentro de la secuencia de aminoácidos) que se encuentran cerca debido al plegamiento tridimensional de la proteína. Se cree que la mayoría de los epítopes son esencialmente conformacionales y es particularmente difícil definirlos con respecto a los alérgenos



en un alimento, pues el procesamiento de este puede perturbar la estructura nativa de la proteína ⁽¹⁴⁾.

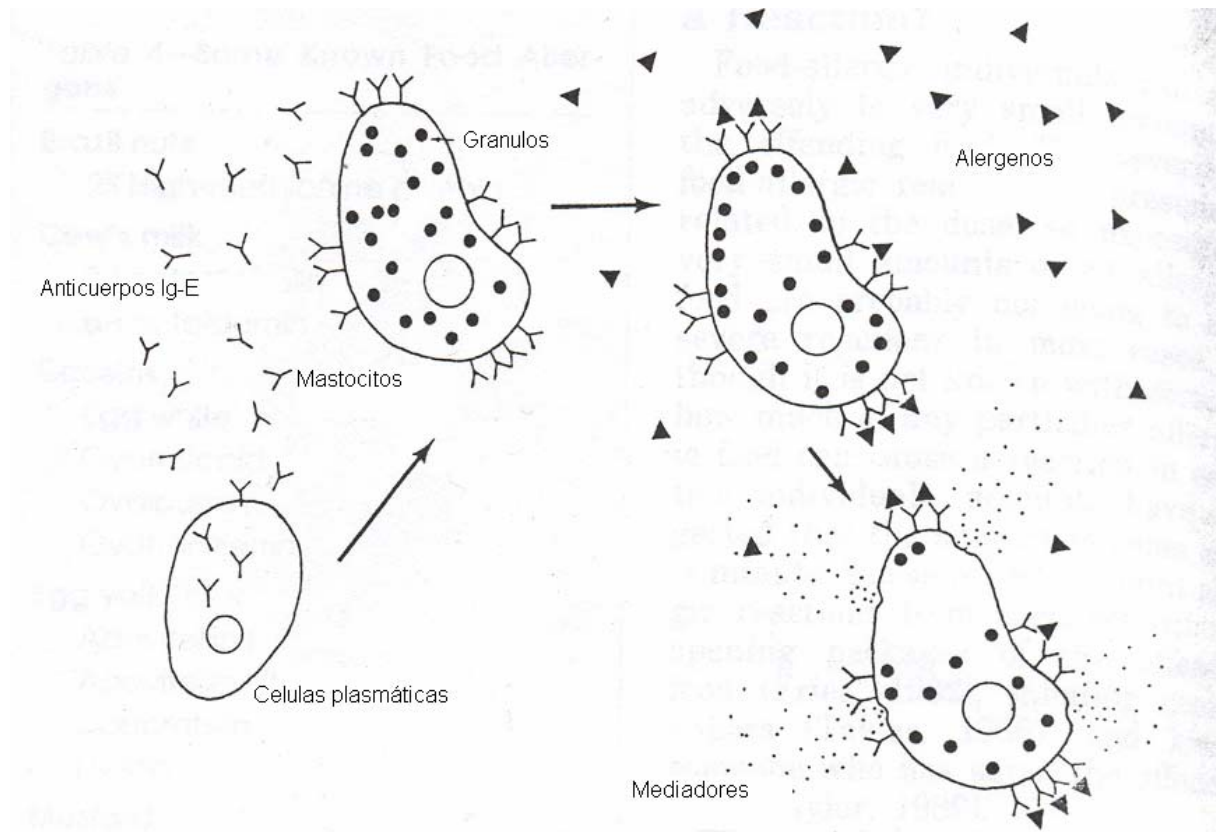


Figura 3.4 Mecanismos de reacciones alérgicas mediadas por anticuerpos Ig-E.



4. Antecedentes

Las alergias alimentarias provocadas por el consumo de ajonjolí han llevado a la identificación y caracterización de los alérgenos presentes dichas semillas. Diversos grupos de investigadores han identificado en primer lugar el tipo de proteínas presentes en el ajonjolí, posteriormente la identificación de la proteína causante de alergias y por último la caracterización de la misma.

Para determinar si la contribución de las proteínas globulinas 11S y/o albúminas 2S a la alta calidad nutricia del ajonjolí es cuantiosa o no, Tai et al. (1999) clonó las secuencias de cDNA correspondientes a los precursores de ambas proteínas. Las secuencias de aminoácidos obtenidas indican que la albúmina 2S es rica en azufre, debido a la cantidad de metioninas que contiene, no así la globulina 11S.

En la fracción proteica soluble de la semilla de ajonjolí se fraccionó simultáneamente una proteína relativamente abundante con una masa molecular ≈ 13 kDa, que corresponde a la albúmina 2S soluble (β -globulina), y que puede ser cortada en dos subunidades de 9 y 4 kDa al ser tratada con β -mercaptoetanol. Este grupo obtuvo y secuenció una clona completa de cDNA con marco de lectura abierto, que codifica para un precursor de la albúmina 2S de reserva (*Figura 4.1*).

El fragmento de cDNA comprende 679 nucleótidos: una secuencia de 42 nucleótidos no traducible en el extremo 5', un marco de lectura abierto de 447 nucleótidos y una secuencia no traducible de 190 nucleótidos en el extremo 3'. La secuencia traducida de aminoácidos contiene 148 residuos abundantes en aminoácidos azufrados: 15 residuos de metionina y 10 de cisteína en la secuencia final de 110 residuos de la proteína madura predicha. A diferencia de los bien estudiados precursores de albúmina 2S de *Arabidopsis* y de la calabaza, se cree que el precursor de albúmina 2S del ajonjolí posee una secuencia de señalización amino-terminal de 21 residuos y también que se parte en dos subunidades de 38 y 72 residuos en su forma madura, probablemente hidrolizada por la asparaginil-endopeptidasa. Ocho residuos conservados de cisteína están presentes en la albúmina 2S y podrían estar involucrados en la formación de uniones disulfuro.

La abundancia de la albúmina 2S sugiere que la secuencia no traducible en el extremo 5' contiene fuertes promotores que se expresan específicamente durante la síntesis de los cuerpos proteicos en la maduración de la semilla, y que la caracterización de estos promotores puede proveer información útil para la



investigación de la regulación de los genes durante la maduración y una aplicación potencial en plantas de ajonjolí transgénico.

Así mismo Tai, et al obtuvo y secuenció una clona completa de cDNA con marco de lectura abierto, que codifica para un precursor de la globulina 11S de reserva (*Figura 4.2*).

**Secuencia de aminoácidos precursor de la albúmina 2S.
*Sesamum indicum***

```
1 MARFTIVLAV LFAAALVSAS AHKTVVTTSV AEEGEEENQR GCEWESRQCQ
MRHCMQWMRS
61 MRGQYEEESFL RSAEANQGQF EHFRECCNEL RDVKSHCRCE ALRCMMRQM
Q EYGMEQEMQ
121 QMQQMMQYLP RMCGMSYPTE CRM RPIFA
```

Figura 4.1 Secuencia de aminoácidos del precursor de la albúmina 2S (β -globulina). Número de acceso AF091841⁽²⁶⁾.

El fragmento de cDNA comprende 1576 nucleótidos: una secuencia de 14 nucleótidos no traducible en el extremo 5', un marco de lectura abierto de 1380 nucleótidos y una secuencia no traducible de 182 nucleótidos en el extremo 3'. La secuencia traducida de aminoácidos contiene 459 residuos de aminoácidos posee una secuencia de señalización amino-terminal de 21 residuos, igualmente es cortada en dos subunidades de 256 y 182 residuos en su forma madura, probablemente hidrolizada por la asparaginil-endopeptidasa, el peso molecular de las subunidades es de 29,389 y 20,300 Da.

Siguiendo con sus estudios, Tai et al. (2001) clonó una secuencia de cDNA que codifica para otro precursor de la albúmina 2S (*Figura 4.3*) y de la globulina 11S, además de un precursor de la globulina 7S que es una proteína de reserva que se encuentra en menor cantidad. Se encontró que la albúmina 2S así como la 11S no son proteínas ricas en azufre, por lo que se deduce que no todas las isoformas de la albúmina 2S son ricas en azufre.

**Secuencia de aminoácidos precursor de la globulina 11S
Sesamum indicum.**

1	MVAFKLLAL	SLSLLVSAAI	AQTREPRLTQ	GQQCRFQRIS	GAQPSLRIQS
	EGGTTELWDE				
61	RQEQQCAGI	VAMRSTIRPN	GLSLPNYHPS	PRLVYIERGQ	GLISIMVPGC
	AETYQVHRSQ				
121	RTMERTEASE	QQDRGSVRDL	HQKVHRLRQG	DIVAIPSGAA	HWCYNDGSED
	LVAVSINDVN				
181	HLSNQLDQKF	RAFYLGGVP	RSGEQEQQAR	QTFHNIFRAF	DAELLSEAFN
	VPQETIRRMQ				
241	SEEEERGLIV	MARERMTFVR	PDEEEGEQEH	RGRQLDNGLE	ETFCTMKFRT
	NVESRREADI				
301	FSRQAGRVHV	VDRNKLPIK	YMDLSAEKGN	LYSNALVSPD	WSMTGHTIVY
	VTRGDAQVQV				
361	VDHNGQALMN	DRVNQGEMFV	VPQYYTSTAR	AGNNGFEWVA	FKTTGSPMRS
	PLAGYTSVIR				
421	AMPLQVITNS	YQISPNQAQA	LKMNRGSQSF	LLSPGGRRS	

Figura 4.2 Secuencia de aminoácidos del precursor de la globulina 11S (α -globulina). Número de acceso AF091842 ⁽²⁶⁾.

El fragmento de cDNA comprende 678 nucleótidos: una secuencia de 41 nucleótidos no traducible en el extremo 5', un marco de lectura abierto de 462 nucleótidos y una secuencia no traducible de 175 nucleótidos en el extremo 3'. La secuencia traducida de aminoácidos contiene 153 residuos la cual posee una secuencia de señalización amino terminal de 21 residuos y también que se divide en dos subunidades de 43 y 72 residuos en su forma madura, probablemente hidrolizada por la asparaginil-endopeptidasa. Ocho residuos de cisteína conservados están presentes en la albúmina 2S los cuales podrían estar involucrados en la formación de uniones disulfuro. Comparando la secuencia de aminoácidos de las dos proteínas 2S albúminas descritas por este grupo, presentan el 47% de homología y 35% de identidad.

Pastorello et al. (2001) identificó el alérgeno clínicamente más importante de la semilla de ajonjolí, una proteína heterodimérica con peso molecular $\approx$ 9kDa, no glicosilada; su secuencia de aminoácidos mostró que se trata de una albúmina 2S con un punto isoeléctrico de 7.3, las subunidades pequeña y grande poseen un pI de 6.5 y 6.0 respectivamente. Dichas subunidades fueron identificadas por la secuencia de su amino terminal en el caso de la subunidad pequeña y las secuencias internas de la subunidad grande (Figura 4.4).



**Secuencia de aminoácidos precursor de la albúmina 2S
Sesamum indicum.**

1 MAKKLALAAV LLVAMVALAS ATTYTTTVTT TAIDDEANQQ SQQCRQQLQG
RQFRSCQRYL
61 SQGRSPYGGE EDEVLEMSTG NQQSEQSLRD CCQQLRNVDE RCRCEAIRQA
VRQQQEGGY
121 QEGQSQQVYQ RARDLPRRCN MRPQQCQFRV IFV

Figura 4.3 Secuencia de aminoácidos del precursor de la albúmina 2S. Numero de acceso AF240005. Proteína de reserva pobre en aminoácidos azufrados presente en semillas de ajonjolí (*Sesamum indicum*) ⁽²⁷⁾.

Secuencia de aminoácidos de la albúmina 2S de *Sesamum indicum* (Subunidad grande)

ARDLPRRCNM RPQQCAF

Figura 4.4 Secuencia de aminoácidos de la proteína 2S albúmina identificada por Pastorello (2001) ⁽¹⁵⁾.

Comparando la secuencia de aminoácidos presentada con las descritas por Tai et al. (2001 y 1999), se encuentra mayor homología con la subunidad grande reportada por Tai et al. (2001). Dicha proteína fue designada **Ses i 1** por la Organización Mundial de la Salud y por el Sub-Comité de nomenclatura de alergenos de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología.

Tabla 4.1 Secuencias internas de cuatro proteínas identificadas como alergénicas.

<i>Bandas</i>	<i>Secuencia de aminoácidos</i>	<i>Homologa a:</i>
7 kDa	QMQQEYGM EQEMQM QMMQYLPR	Precursor de 2S albúmina (Semilla de ajonjolí)
34 kDa	IDILVNNAEQYEASTVEEIDEPR	Proteína de semilla madura.
45 kDa	SQQEEFFK	Globulina 7S tipo vicilina
78 kDa	TAADELSDVNR	Proteína embrionaria (soya)

La identificación de alergenos en semillas de ajonjolí fue continuada por Beyer et al. (2002) mediante el uso de ensayos inmunológicos, electroforesis SDS-PAGE y electroforesis en 2 - dimensiones identificaron 10 proteínas con uniones Ig-E, de 78, 52, 45, 34, 32, 29, 25, 20, 9 y 7 kDa. Sin embargo solo las cuatro fracciones de 7,



34, 45 y 78 kDa, fueron reconocidas por el 30%, 60%, 75% y 50% de los pacientes respectivamente (*Tabla 4.1*).

La proteína de 78 kDa no fue reconocida por todos los pacientes en la electroforesis de dos dimensiones y junto con la proteína de 34 kDa se consideran proteínas embrionarias en la semilla madura, la proteína de 45 kDa es una globulina 7S tipo vicilina y la proteína de 7 kDa pertenece a la familia de las albúminas 2S. La globulina 7S tipo-vicilina (**Ses i 3**) y la 2S albúmina (**Ses i 2**), pertenecen a las proteínas de reserva y las cuales son alérgenos ya conocidos en varias plantas. Se encontró que la secuencia de la proteína 2S albúmina (**Ses i 2**) con peso molecular de 7kDa es idéntica a la subunidad grande publicada por Tai et al. (1999).

Las dos proteínas 2S albúminas (Ses i 1 y Ses i 2) pueden ser identificadas como alérgicas, ya que la homología global entre estas albúminas 2S es moderada y éstas no parecen exhibir reacciones de entrecruzamiento, pueden considerarse como alérgenos universales. Se requiere de estudios posteriores con Ses i 1 y Ses i 2 recombinantes para determinar la importancia de ambas albúminas 2S en la alergia a la semilla de ajonjolí.

La globulina 7S tipo vicilina también se identificó como alérgeno presente en las semillas de ajonjolí (Ses i 3) y en comparación con la albúmina 2S no es abundante en la semilla de ajonjolí y solo consta de un polipéptido, en vez de dos subunidades unidas por puentes disulfuro como ocurre en la albúmina 2S.

Las otras dos proteínas alérgicas encontradas, de 34 y 78 kDa, resultaron homólogas a la proteína de maduración de semilla y a la proteína embrionaria más abundante del frijol y de soya. Sin embargo no se ha obtenido la secuencia completa de estas proteínas, ni tampoco se ha verificado el papel que desempeñan como alérgeno de la semilla de ajonjolí ⁽²⁾.

Wolff et al. (2003) mediante el uso de ensayos inmunológicos detectó una proteína de 14 kDa como el mayor alérgeno presente en las semillas de ajonjolí, posteriormente identificada como parte de la familia de las 2S albúmina. Después de separarla mediante HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) se sometió a proteólisis con Lys C, generando 3 péptidos (*Figura 4.5*), de los cuales solo el péptido B tuvo reacción positiva a ensayos de blot puntuales, lo cual indica que este péptido contiene epítopes lineales y corresponde a los residuos 24 – 94 de la proteína completa (precursor albúmina 2S), y cinco de los diez residuos de cisteína están presentes en este péptido. Esta proteína tiene 148 residuos de aminoácidos y



es rica en aminoácidos azufrados (15 residuos de metionina y 10 residuos de cisteína). Comparando con otros precursores de la albúmina 2S (calabaza, *Arabidopsis*), el precursor de la albúmina 2S encontrado posee una secuencia amino terminal de 21 residuos, y se divide en dos subunidades de 38 y 72 (7 kDa) residuos en su forma madura.

Péptidos obtenidos por digestión con Lys C**Precursor albúmina 2S**

Péptido A MARFT IVLAV LFAAA LVSAS AHK

Péptido B TVVTT SVAEE GEEEN QRGCE WESRQ CQMRH CMQWM RSMRG
QYEES FLRSA EANQG QFEHF RECCN ELRDV KS

Péptido C HCRCE ALRCM MRQMQ QEYGM EQEMQ QMQQM MQYLP RMCGM
SYPT E CRM RP IFA

Figura 4.5 Secuencia de péptidos obtenidos por digestión con Lys C.

Comparando las secuencias presentadas, éstas son idénticas con la reportada del precursor de la albúmina 2S por Tai et al. (1999). Por otro lado el otro precursor de la albúmina 2S descrita por Tai et al. (2001) también fue aislada por este grupo y se demostró que tiene baja alergenicidad mediante los métodos utilizados.

La secuencia de aminoácidos de la proteína de 7 kDa descrita por Beyer et al. (2002), es idéntica a la subunidad grande reportada por Tai et al. (1999) y por lo tanto con la reportada en este estudio (14 kDa). La diferencia en el tamaño de estas proteínas se debe a la proteólisis de la albúmina 2S por la asparaginil-endopeptidasa. ⁽⁷⁾.

En este estudio también se detectaron reacciones mediadas por Ig-E con proteínas de 20-25 kDa y 30-35 kDa, lo cual sugiere que estas proteínas son alergenitos menores presentes en semillas de ajonjolí.

Wolff et al. (2004) identificó y caracterizó los epítopes β -celulares lineales de la proteína β -globulina de 14 kDa, en su estudio anterior Wolff et al. (2003) determinó que el péptido B es el que contenía los epítopes lineales, por lo que para determinar la secuencia de aminoácidos donde se da la unión con los anticuerpos Ig-E del péptido B, se sintetizaron 6 péptidos que abarcan toda la secuencia del péptido B (Tabla 4.2).



De los péptidos sintetizados solo tres, correspondientes a los residuos de aminoácidos 44-63 (C), 64-86 (E), y 74-94(F) del péptido B presentaron gran intensidad en las uniones con anticuerpos Ig-E. Para detectar la secuencia exacta de unión con los anticuerpos Ig-E, se sintetizaron 17 péptidos de 10 aminoácidos cada uno, de estos solo 9 presentaron uniones Ig-E mostrando secuencias en común y tres se determinaron como inmunodominantes (*Tabla 4.3*). Dos de estos péptidos que mostraron unión entre los epítopes y los anticuerpos Ig-E, están presentes en la subunidad pequeña de la albúmina 2S.

Tabla 4.2 Secuencia de aminoácidos de 6 péptidos sintetizados que cubren la secuencia completa del péptido B (albúmina 2S) obtenido mediante rompimiento con Lys C. El tamaño de cada péptido sintetizado es de 20 residuos de aminoácidos, difiriendo en 10 residuos de aminoácidos.

<i>Péptido</i>	<i>Secuencia de aminoácidos</i>	<i>Posición de cada peptido en la secuencia completa de la albúmina 2S</i>
A	TVVTTSVAEEGEEENQRGCE	24-43
B	GEEENQRGCEWESRQCQMRH	34-53
C	WESRQCQMRHCMQWMRSMRG	44-63
D	CMQWMRSMRGQYEESFLRSA	54-73
E	QYEESFLRSAEANQGQFEHFREC	64-86
F	EANQGQFEHFRECCNELRDVK	74-94

Tabla 4.3 Secuencia de aminoácidos que comparten los 9 péptidos sintetizados del Péptido B de la albúmina 2S. Se presentan los tres péptidos considerados inmunodominantes (>80% pacientes lo detectaron).

<i>Posición en la secuencia completa de la β-globulina</i>	<i>Secuencia de aminoácidos en común</i>
78-83	GQFEHF
82-87	HFRECC
48-55	QCQMRHCM
54-63	CMQWMRSMRG
<i>Péptidos inmunodominantes</i>	<i>Secuencia de aminoácidos</i>
1	SRQCQMRHCM
2	QCQMRHCMQW
3	NQGQFEHFREC

Moreno et al. (2005), purificó la proteína alergénica Ses i 1 con peso molecular de 12 062 Da. Dicha proteína ha demostrado ser estable a condiciones ácidas, procesos térmicos (90 °C) y a la digestión in vitro. La estabilidad que presenta esta proteína es



atribuida a la estructura rígida de las albúminas 2S, gracias a los residuos de cisteína que están conservados. Está conformada por dos subunidades con pesos moleculares de ≈ 3 y ≈ 6 kDa, las cuales fueron identificadas mediante electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras.

En la tabla 4.4 se muestran las tres proteínas que se han clasificado como alergénicas presentes en semillas de ajonjolí (*Sesamum indicum*).

Tabla 4.4 Proteínas alergénicas presentes en semillas de ajonjolí.

Ses i 1 Tai et al. 2001 Pastorello et al. 2001	Albumina 2S PM 12 062 Da. 2 subunidades (≈ 3 y ≈ 6 kDa). No es rica en aminoácidos azufrados.
Ses i 2 Tai et al. 1999 Beyer et al. 2002	Albumina 2S PM 14 kDa (7 kDa). Rica en aminoácidos azufrados. (Cisteína y metionina)
Ses i 3 Beyer et al. 2002	Globulina 7S tipo vicilina. PM 45 kDa.

En la obtención de los aislados proteicos a partir de semilla de ajonjolí a nivel industrial se involucran procesos físicos y químicos que pueden incidir en la alteración de las proteínas alergénicas o en su eliminación, de tal suerte que lo deseable es que no estén y así lograr un producto inocuo por lo que es necesario la búsqueda de estas proteínas de tal forma que en el presente trabajo se ha fijado los siguientes objetivos.



5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- ✓ Determinar la presencia de la proteína alergénica albúmina 2S, en aislados proteicos de ajonjolí obtenidos por diferentes procedimientos, a nivel industrial y de laboratorio.

5.2 Objetivos particulares

- ✓ Obtener aislados proteicos a nivel laboratorio a partir de una variedad de ajonjolí (*Sesamum indicum cremoso Chiapas*), utilizando dos métodos de concentración contribuyendo al diseño de un proceso controlado que garantice la eliminación de las proteínas alergénicas de bajo peso molecular.
- ✓ Determinar la composición proximal de los aislados proteínicos industriales y de los obtenidos a nivel laboratorio.
- ✓ Establecer la metodología para la identificación de proteínas de bajo peso molecular.
- ✓ Evaluar si el proceso de concentración por ultrafiltración a nivel industrial permite reducir o eliminar las proteínas alergénicas que presenta la semilla de ajonjolí.
- ✓ Realizar una caracterización proteica del aislado mediante extracciones con distintos solventes y mediante la solubilidad a distintos valores de pH.



6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

Marca Sigma Aldrich

Ácido clorhídrico, albúmina sérica bovina (ABS), fenol folin-ciocalteau.

Marca J. T. Baker

Hidróxido de sodio, cloruro de sodio, glicerol anhidro, 1 – propanol, ácido acético glacial, borato de sodio, glicerol anhidro, metanol, carbonato de sodio anhidro granular, sulfato de cobre, ácido tricloroacético (TCA).

Marca Productos Químicos de Monterrey

Tartrato de potasio

Marca High Purity

Hexano

Marca BioRad

2 – mercaptoetanol, acrilamida 99.9%, glicina, persulfato de amonio, azul brillante de coomassie G-250, TEMED, tricina, papel filtro tic blot paper criterion size, azul de bromofenol, bis-acrilamida, BioRad protein assay

Marca Research Organics

Lauril sulfato de sodio (SDS), Tris – free base pure (Tris – hidroximetilaminometano)

Marca Perkin-Elmer

Membrana de polivinildifluoruro

Marca Mallinckrodt Analytical Research

Ácido bórico



6.2 Soluciones

Electroforesis SDS-PAGE

- Acrilamida (30% w/v Acrilamida y 2.7% w/v Bis-acrilamida)
- Buffer Gel Separador (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)
- Buffer Gel Concentrador (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)
- Buffer de Tratamiento de la muestra (0.125M Tris-HCl, 4% SDS, 20% Glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0.01% azul de bromofenol, pH 6.8)
- Buffer de corrida (0.025 M Tris-HCl, 0.192 M glicina, 0.1% SDS, pH 8.3)
- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 10%
- Persulfato de Amonio 10%
- Solución Teñidora (0.025% Azul coomassie G-250, 40% metanol, 7% ácido acético)
- Solución Desteñidora I (50% Metanol, 10% ácido acético)
- Solución Desteñidora II (7% Ácido acético, 5% metanol)
- TEMED

Soluciones electroforesis TSDS-PAGE

- Acrilamida (30% w/v Acrilamida y 2.7% w/v Bis-acrilamida)
- Buffer Tris-HCl/SDS (3 M Tris-HCl, 0.3% SDS)
- Glicerol 80%
- Persulfato de amonio 10%
- TEMED
- Buffer cátodo, reservorio superior (100mM Tris-HCl, 100mM Tricina, 0.1% SDS)
- Buffer ánodo, reservorio inferior (200mM Tris-HCl,, pH 8.9)



Soluciones determinación de proteína por el método de Lowry-SDS

- CTC (Carbonato de sodio 10%, Tartrato de potasio 0.2%, Sulfato de cobre.5H₂O 0.1%)
- NaOH 0.8 M
- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 10%
- Solución A: Se mezclaron volúmenes iguales de las siguientes soluciones y en el mismo orden: CTC, NaOH y SDS.
- Solución B: Reactivo de Folin-Ciocalteu-fenol (SIGMA). Realizar una dilución 1:6. Se preparó antes de desarrollar la determinación.

Soluciones transferencia a membrana de PVDF

- Buffer de transferencia (25 mM Tris Base (3g/L), 192 mM Glicina (14.4 g/L), 20% Metanol (200mL), 0.1% SDS (1g/L).
- Solución Teñidora (0.1% Azul Coomassie R-250, 50% Metanol, 1 % de ácido acético).
- Solución Desteñidora. (50% Metanol).

6.3 Muestras

Se trabajó con dos aislados proteicos de ajonjolí (*Sesamum indicum*), proporcionados por la empresa procesadora de ajonjolí Distribuidora Internacional de Productos Agrícolas S.A. de C.V. (DIPASA. Ubicada en Celaya, Guanajuato.), dichos aislados se obtuvieron a partir de una mezcla de variedades, el proceso de obtención se muestra en la figura 6.1. Las muestras se almacenaron hasta su uso protegidos de la luz y el oxígeno y a 4 °C.

Sesaprot ® es un aislado comercial concentrado por ultrafiltración y el segundo aislado (AP-PI) fue concentrado por precipitación isoeléctrica, se trabajó de igual manera con la harina de ajonjolí de la cual se partió para la obtención de estos aislados. Las tres muestras restantes fueron dos aislados obtenidos a nivel laboratorio en las condiciones establecidas por la empresa a partir de una sola variedad de semillas de ajonjolí (*Sesamum indicum cremoso Chiapas*) donadas por la empresa DIPASA, así como de la harina de ajonjolí de la cual se partió para obtener estos aislados (Figura. 6.2). Las muestras se almacenaron en recipientes de plástico, herméticos, no translúcidos, a fin de evitar reacciones de oxidación a una temperatura de 4° C.

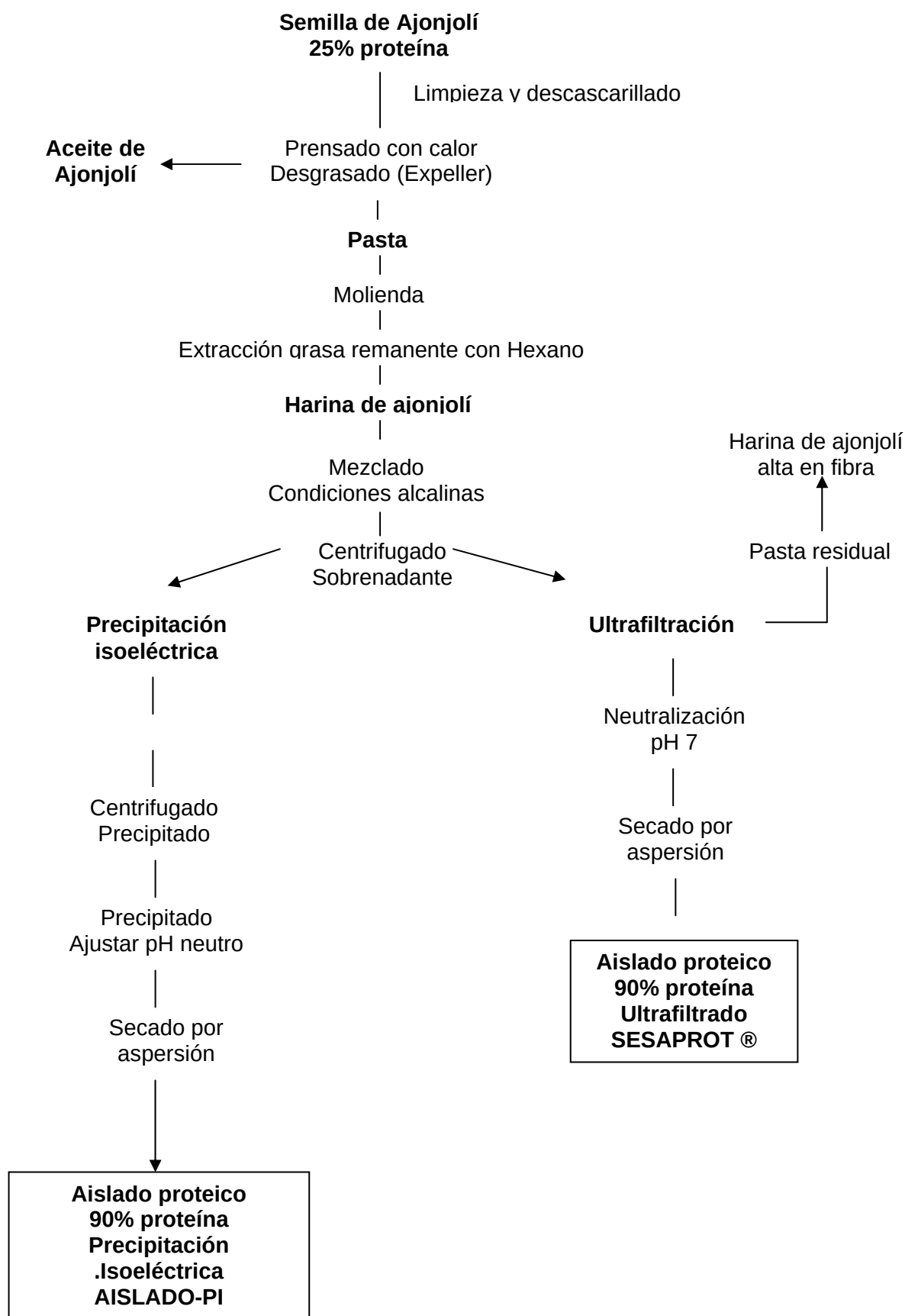


Figura 6.1 Diagrama de obtención de Aislados proteicos a nivel industrial por la empresa DIPASA.

**Tabla 6.1** Código de las muestras utilizadas en la investigación.

	Muestras	Código
Proceso a nivel industrial.	Aislado proteínico de ajonjolí concentrado por ultrafiltración DIPASA.	Sesaprot®
	Aislado proteínico de ajonjolí concentrado por precipitación isoelectrica DIPASA.	AP-PI
	Harina de ajonjolí DIPASA	HA-DIPASA
Proceso a nivel laboratorio.	Aislado proteínico de ajonjolí concentrado por ultrafiltración (<i>Sesamum indicum cremoso Chiapas</i>)	L-UF
	Aislado proteínico de ajonjolí concentrado por precipitación isoelectrica (<i>Sesamum indicum cremoso Chiapas</i>)	L-PI
	Harina de ajonjolí (<i>Sesamum indicum cremoso Chiapas</i>)	HA-Chiapas

6.4 Estrategia experimental

La estrategia experimental que se siguió para determinar la presencia de proteínas alergénicas en las muestras analizadas es la presentada en la figura 6.3.

A cada aislado se le realizó un análisis proximal de acuerdo a las metodologías establecidas en la AOAC 1995, determinando de esta manera si el porcentaje de proteína es el característico de un aislado proteico y por otro lado comparar la composición con otros aislados proteicos como el de soya.

De igual manera se realizó una caracterización proteica por medio de curvas de solubilidad y extracción con distintos solventes, ésta ultima solo se realizó a las muestras L-UF y HA-Chiapas para obtener el perfil proteico de esta variedad de ajonjolí.

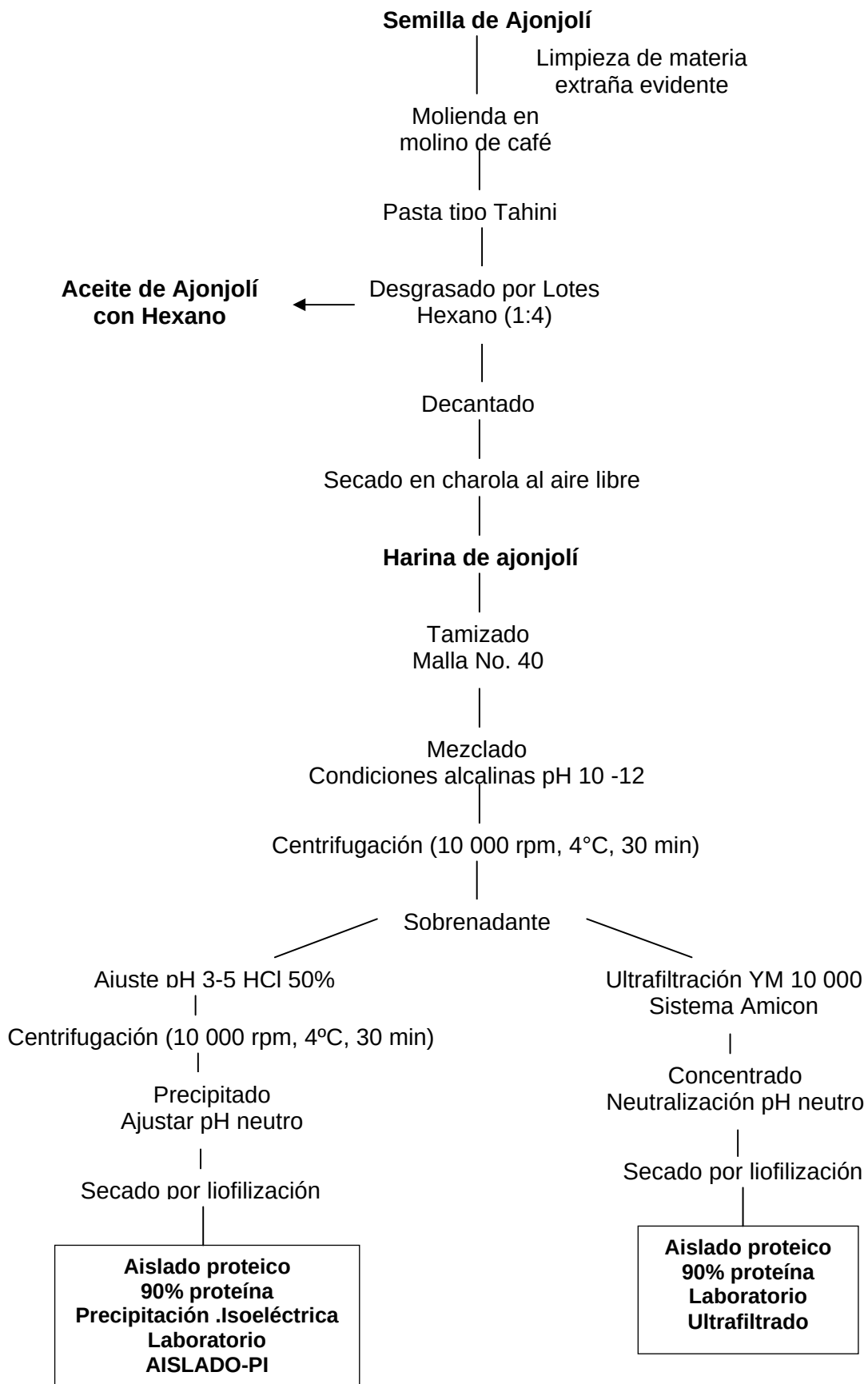


Figura 6.2 Proceso de obtención de aislados proteicos a partir de *Sesamum indicum* cremoso Chiapas.

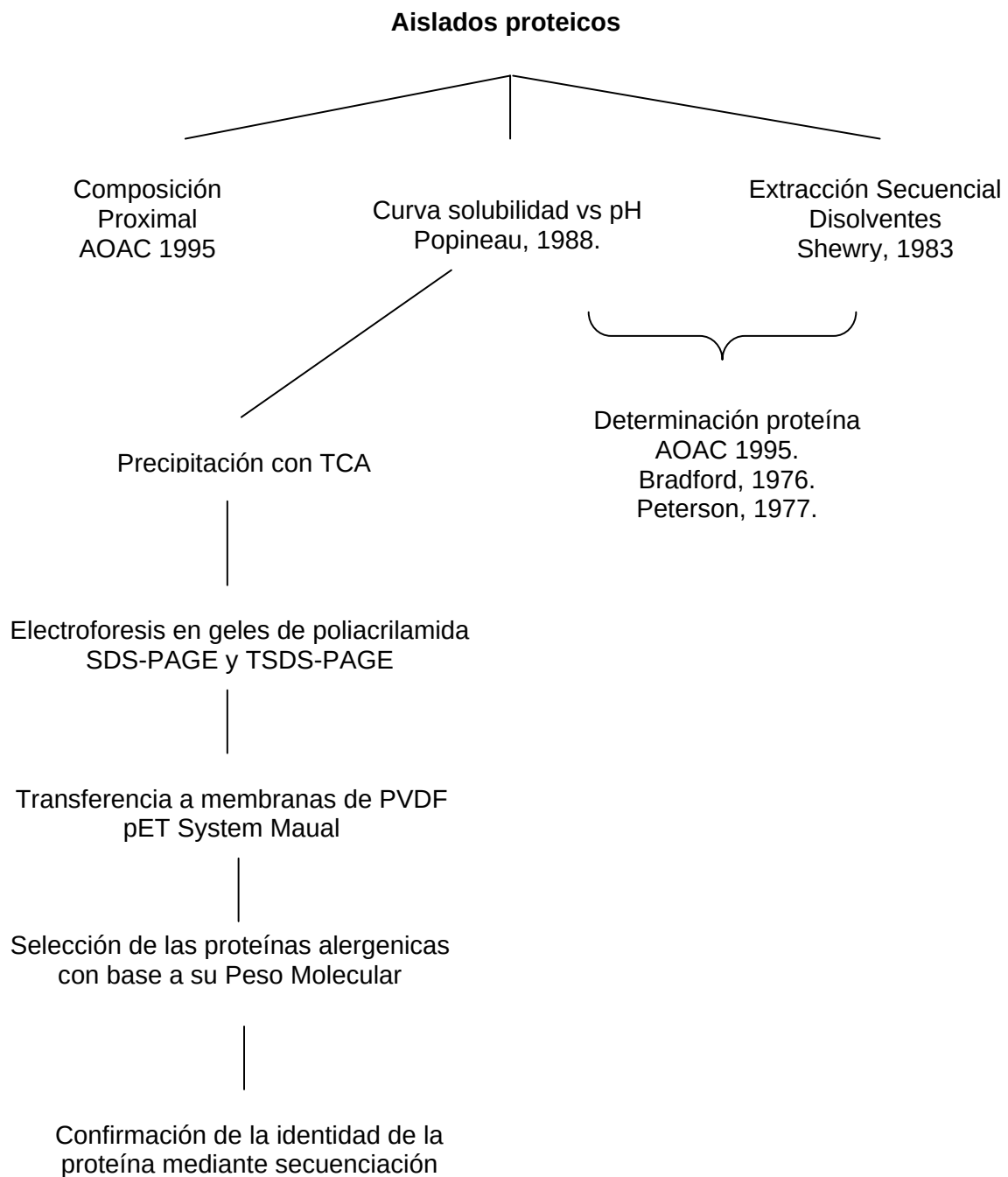


Figura 6.3 Estrategia experimental de identificación de la presencia de proteínas alergénicas en aislados proteicos.



6.5 Obtención de aislados proteicos

Para obtener los dos aislados proteicos a partir de la variedad *Sesamum indicum cremoso Chiapas* se siguió la metodología planteada en la figura 6.2. La semilla después de ser limpiada de toda materia extraña, se molió en un molino para café marca Braun. La pasta obtenida se desgrasó por Lotes con Hexano y después se dejó evaporar el hexano residual al aire libre en charolas de aluminio.

A la harina de ajonjolí obtenida se le realizó un análisis proximal para determinar el contenido de proteína de cual se partió para obtener los aislados. Dicha harina se hizo pasar por un tamiz (Malla No. 40) para tener un tamaño de partícula homogéneo, después se sometió a un mezclado en condiciones alcalinas para extraer las proteínas. La suspensión obtenida se centrifugó (10 000 rpm, 4°C, 30 min) y al sobrenadante obtenido se sometió a los dos procesos de concentración.

La precipitación isoelectrica se realizó ajustando el pH de la solución entre 3 – 5, la suspensión obtenida se centrifugó (10 000 rpm, 4°C, 30 min). Al aislado obtenido se le ajustó el pH a 7 y se secó por liofilización.

El proceso de concentración por ultrafiltración se realizó haciendo pasar la solución de proteínas por una malla YM 10 000, el concentrado obtenido se neutralizó y se secó por liofilización.

6.6 Composición Proximal

La caracterización proximal de los aislados proteicos se realizó de acuerdo a los métodos reportados en la AOAC (Método No. 1995), 16ª Edición, 5ª Revisión. Humedad (Método No. 925.09), contenido de ceniza (Método No. 923.03), nitrógeno total por método Kjeldhal (Método No. 981.10), grasa cruda (Método No. 920.39) y carbohidratos por diferencia.

6.7 Solubilidad de proteínas a distintos valores de pH.

Se realizó una curva de solubilidad en función del pH de acuerdo a la estrategia propuesta por Popineau y col (1988) ⁽¹⁷⁾, preparando una suspensión de cada muestra con un nivel de proteína de 1% (p/v) en un volumen de 30 mL de disolvente, en este caso agua.

Cada suspensión se ajustó a los diferentes valores de pH (2-12) con HCl 1N y NaOH 0.8 N, el valor de pH se registró con un potenciómetro marca Beckman, modelo $\Phi 34$ pH meter. La suspensión obtenida se agitó a 12 rpm durante 1 hora 30 minutos en



un agitador orbital marca New Brunswick; se registró nuevamente el valor de pH, si presentó cambios se ajustó al pH deseado. Por último se determinó la cantidad de proteína soluble en el sobrenadante por la técnica de Lowry-SDS ⁽¹⁶⁾, tras haber centrifugado la suspensión a 10 000 rpm por 30 minutos a 4°C en una centrifuga Beckman modelo J2-MC.

6.8 Solubilidad de proteínas en distintos solventes.

La extracción de proteínas utilizando distintos solventes se realizó de acuerdo a lo descrito por Shewry et al. (1983) ⁽²⁵⁾. Se trabajó con aislados con un tamaño de partícula homogéneo, en el caso de los aislados obtenidos en el laboratorio, éstos se hicieron pasar por un tamiz malla 40 y en el caso de los aislados donados por la empresa DIPASA se utilizaron directamente por el tamaño de partícula que presentaban.

De acuerdo al contenido de proteína obtenido por el análisis proximal, se pesaron 3 g de proteína de cada muestra y se extrajeron secuencialmente las proteínas en agitación con 30 mL de cada disolvente a una temperatura de 20 °C por una hora. Los disolventes utilizados fueron: a) Agua desionizada pH 7 para la extracción de albúminas, b) Solución de NaCl 0.5 M para la extracción de proteínas solubles en soluciones salinas-globulinas, c) Solución con 50% (v/v) de 1-propanol, 2% (v/v) 2-mercaptoetanol y 1% (v/v) de ácido acético para la extracción de prolaminas, d) Solución 0.05 M de buffer de boratos pH 10, 1% (v/v) 2-mercaptoetanol y 1% (w/v) Dodecil sulfato de sodio (SDS) para la extracción de glutelinas.

El sobrenadante de la extracción de prolaminas se mezcló con 2 volúmenes de NaCl 1.5 M a una temperatura de 4°C, posteriormente se centrifugó y el precipitado se secó por liofilización. Todos los demás sobrenadantes se liofilizaron, una vez secos se determinó el contenido de proteína total por la técnica de micro Kjeldahl.

6.9 Identificación de las proteínas mediante geles de poliacrilamida Tris-Glicina-SDS (SDS-PAGE) ⁽¹²⁾.

La electroforesis en geles de acrilamida permite la separación de proteínas con diferente peso molecular y/o carga eléctrica, procedimiento muy útil para la identificación de los componentes de una mezcla de proteínas y en algunos casos para su purificación. Todas las técnicas electroforéticas aprovechan una característica de las proteínas inherente a su naturaleza: su carga eléctrica. Esta



propiedad y más precisamente la carga eléctrica neta, hace que las proteínas puedan migrar en un campo eléctrico. El movimiento de estas partículas cargadas se ve influenciado dramáticamente por sus interacciones con la matriz del gel y las sustancias con ella.

La electroforesis en geles de acrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) es una técnica empleada por la gran resolución que proporciona. Presenta la característica de que las proteínas migran a una velocidad que está en función inversa del logaritmo de su masa molecular. El SDS es un detergente iónico que se une a las proteínas proporcionalmente a su tamaño y por tanto su separación en el gel se hará según este criterio.

La electroforesis descrita por Laemmli (1970) aumenta la resolución porque los complejos SDS-proteína corren a través de dos geles de diferente densidad: el gel superior o concentrador, que es suficientemente laxo como para permitir la formación de un frente homogéneo y el gel inferior o separador, que es menos denso y permite que cada proteína tenga una velocidad diferente en función de su masa molecular.

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, según el sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970). Las concentraciones de acrilamida /bis-acrilamida utilizadas en el gel concentrador y separador fueron 6 y 15% respectivamente. La cantidad de proteína utilizada por muestra fue de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Los extractos se diluyeron en un buffer de tratamiento que contiene Tris-HCl 0.125M, pH 6.8, 4% de SDS, 20% glicerol, 10% de β -mercaptoetanol, 0.01% azul de bromofenol; antes de ser introducidas en el gel se calentaron 5 min a una temperatura de 92°C. Las muestras se corrieron a 100V por 3 horas y se tiñeron con azul de coomassie.

Para preparar el gel, primero se añadió el gel separador entre los vidrios de soporte del gel y se recubrió con isopropanol, para facilitar que la poliacrilamida polimerizase formando una superficie superior horizontal. A continuación se eliminó el isopropanol y sobre el gel separador se añadió el gel concentrador, colocando el peine (1 mm) que definiría los pocillos de carga antes de que ésta polimerizase. Una vez polimerizado, se quitó el peine, se lavaron los pocillos con agua destilada para eliminar restos de poliacrilamida y se colocaron en la cámara de electroforesis MINI-PROTEAN II (Bio-Rad) con el tampón de recorrido. Se aplicó un voltaje de 60V



hasta que todas las muestras se alinearon en el gel concentrador seguidamente se aumentó el voltaje a 100V hasta el final de la electroforesis.

Los proteínas y polipéptidos utilizados como marcadores fueron; Fosforilasa B (97.4 kDa), albúmina sérica bovina (66.2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa) y lisozima (14.4 kDa) (Bio Rad). Para determinar el peso de las bandas se utilizó el densitómetro modelo GS 700 Bio-Rad y el programa Quantity-One.

	Gel Separador 15%	Gel Concentrador 6%
Acrilamida	5 mL	2 mL
Buffer Separador	2.5 mL	
Buffer Concentrador		2.5 mL
Dodecil sulfato de Sodio 10%	100 µL	100 µL
Agua Destilada	2.345 mL	5.345 mL
Persulfato de Amonio 10%	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL

*Utilizar persulfato de amonio recién preparado.

6.10 Identificación de las proteínas mediante geles de poliacrilamida Tris-Tricina-SDS (TSDS-PAGE) ⁽²²⁾.

Las electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS se utilizaron para separar con más resolución aquellas proteínas de un peso molecular entre 5-70 kDa. La preparación del gel así como el tratamiento de muestras fue el mismo que se describió en los geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

Los geles se montaron en la cámara MINIPROTEAN II (Bio-Rad), y en el reservorio superior se puso el Buffer del cátodo y en el reservorio inferior el Buffer del ánodo.

Los polipéptidos utilizados como marcadores de peso molecular fueron; Isomerasa Triosa Fosfato (26.6 kDa), Mioglobina (17 kDa), α -lactoalbúmina (14.2 kDa), Aprotina (6.5 kDa), Cadena insulina B (3.496 kDa) y Bradikina (1.060 kDa) (SIGMA-aldrich). Para determinar el peso de las bandas se utilizó el densitómetro modelo GS 700 Bio-Rad y el programa Quantity-One.



	Gel Separador 15%	Gel Concentrador 4%
Acrilamida	7.5 mL	972 µL
Buffer Tris-HCl/SDS	5 mL	1.86 mL
Agua	0.9 mL	4.67 mL
Glicerol 80%	1.58 mL	-----
Persulfato de Amonio* 10%	75 µL	40 µL
Temed	10 µL	4.5 µL

*Utilizar persulfato de amonio recién preparado.

6.11 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford ⁽³⁾.

La determinación de proteína soluble por el método de Bio-Rad, está basado en el método de Bradford (1976). Involucra la adición de un colorante ácido a la solución de proteína y su posterior lectura espectrofotométrica a 595 nm.

Esta determinación de proteína por Bio-Rad es un ensayo basado en la unión a colorantes, donde un cambio de coloración ocurre debido a la respuesta a varias concentraciones de proteína. La máxima absorbancia de una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250 se encuentra entre 465 nm a 595 nm, cuando la unión a las proteínas ocurre. El colorante existe en tres formas: catiónica (roja), neutra (verde) y aniónica (azul). Bajo condiciones ácidas el colorante esta predominantemente en su forma catiónica (rojo), sin embargo cuando la proteína se une al colorante se convierte a un estado desprotonado (azul). El colorante azul de coomassie se une principalmente a residuos de aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente arginina.

Para realizar la determinación de proteína se realizó una curva patrón (Anexo1), con la ecuación de la recta obtenida y con el dato de absorbancia se calculó la cantidad de proteína en las muestras.

Se realizaron varias diluciones de las muestras, de cada se tomó un volumen de 800 µL y se añadieron 200 µL del reactivo Bio-Rad para tener un volumen final de 1 mL, la reacción se dejó 5 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 3A UV/Visible.

6.12 Cuantificación de proteína por el método de Lowry-SDS ⁽¹⁵⁾

Es un método químico que nos permite cuantificar la cantidad de proteína soluble en una solución. Se basa en la formación de un complejo (cobre-proteína) en un medio



alcalino con la reducción del reactivo de Fenol-Folin, formando especies reducidas de coloración azul que se pueden cuantificar espectrofotométricamente a una longitud de onda de 750 nm.

Para realizar la determinación de proteína se realizó una curva patrón (Anexo2), y a partir de esta curva y con el dato de absorbancia se calculó la cantidad de proteína en las muestras.

El volumen final de las muestras fue de 1 mL así como de la curva patrón. Con agitación continua se agregaron a cada tubo 1 mL de la solución A y se dejó reposar 10 minutos a temperatura 24°C. Al término de estos 10 minutos, se le agregó a cada tubo 0.5 mL de la solución B con agitación continua y se dejó desarrollar la reacción durante 30 minutos. Pasado este tiempo se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Milton Roy Modelo Espectronic 21D.

6.13 Transferencia a membranas de polivinil difluoruro (PVDF).

Técnica desarrollada para proteínas a partir de la transferencia de ácidos nucleicos a nitrocelulosa por capilaridad. La optimización ha resultado en una técnica mediante la cual es posible transferir las bandas de proteínas de un gel de acrilamida a una matriz plana que puede ser de nitrocelulosa, nylon, papel filtro de vidrio activado etc. A su vez el gel puede ser no desnaturalizante, con SDS, con urea, en segunda dimensión, de isoelectroenfoque, etc. La fuerza electroforética es la responsable de la transferencia de las moléculas de proteína de una matriz a la otra, lo cual se produce gracias a la carga negativa que presentan las proteínas en la mayoría de las separaciones electroforéticas en geles de acrilamida y que las hace moverse hacia el ánodo de un campo eléctrico. El resultado es la obtención de una réplica exacta de las bandas de proteína en la nitrocelulosa a partir del gel original.

La técnica involucra varios pasos:

- Lavado del gel de acrilamida en la solución de transferencia.
- Transferencia electroforética de las proteínas del gel a la matriz plana.
- Detección de las proteínas transferidas mediante tinción con azul de coomassie, para después cortar las bandas de proteína transferidas a la membrana y hacer directamente secuencia de aminoácidos, pudiendo así identificarse la proteína.

Después de haber corrido el gel de electroforesis, se removió de las placas de vidrio cortando una esquina para usar como referencia. Se colocó el gel así como el papel filtro (BioRad Extra Tic Blot Paper, criterion size) en envases separados con buffer



de transferencia suficiente para cubrirlos y se mantuvieron en agitación rotatoria por 30 minutos a temperatura ambiente. La membrana de PVDF (Perkin Elmer) se colocó en metanol por 3 minutos para solvatarla, posteriormente se equilibró con el buffer de transferencia por 30 minutos; el papel filtro así como la membrana son el mismo tamaño que el gel que se desea transferir.

Sobre el equipo se colocó un papel filtro empapado del buffer de transferencia, encima del papel filtro se colocó el gel a transferir, sobre éste la membrana de PVDF por último un papel filtro. Para evitar la formación de burbujas de aire, que ocasionaría una mala transferencia se rodó un tubo de ensaye sobre toda la superficie del papel. Se cerró la cámara de transferencia y la fuente de poder se ajustó a 15 V por 1 hora. La membrana se tiñó y destiñó de la misma forma que el gel.

6.14 Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA) (pET System Manual)

Este procedimiento se utiliza para concentrar las proteínas antes de realizar una electroforesis SDS-PAGE.

Se agregaron 100 μ L (1/10 volumen) de TCA al 100% (w/v) a 1 mL de medio y se agitó en vortex por 15 segundos y se dejó reposar en hielo por 15 minutos, pasado este tiempo se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se desechó y el pellet se lavó 3 veces resuspendiéndolo con 100 μ L de acetona y posterior centrifugación a 14 000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante se desecha y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente por 1 hora.



7. Resultados y Discusión

7.1 Obtención de aislados proteicos

De acuerdo a la metodología descrita anteriormente se obtuvo una Harina de ajonjolí a partir de la variedad *Sesamum indicum Cremoso Chiapas*, el rendimiento después de la evaporación del solvente residual fue 40%.

Para la obtención de la harina el tamaño de partícula de la semilla se disminuyó utilizando un molino de café con el cual se esperaba obtener una pasta con un tamaño de partícula homogéneo, sin embargo esto no se obtuvo a pesar de que el tiempo de molienda se extendió; esto provocó que se aumentaran el número de lotes durante la extracción del aceite disminuyendo el rendimiento y que la harina obtenida no tuviera un tamaño de partícula homogéneo, teniendo que volver a moler y hacer pasar por un tamiz perdiendo harina como materia prima para la obtención de los aislados. Por lo tanto se propone utilizar un molino convencional para cereales.

A partir de esta harina se obtuvieron dos aislados proteicos, el primero concentrado por ultrafiltración con un rendimiento del 50%, y el segundo concentrado por precipitación isoeléctrica con un rendimiento del 20%. Estos rendimientos pueden aumentar ya que las condiciones establecidas para los procesos de centrifugación no fueron adecuadas, porque se observó que no toda la materia suspendida sedimentó y formó el pellet; por lo que se propone aumentar el número de r.p.m. (revoluciones por minuto) y/o el tiempo de centrifugado.

7.2 Composición de los aislados proteicos y harinas de ajonjolí

La composición de la harina así como de los aislados nos da indicio de cómo es que el proceso de concentración afectó el porcentaje de grasa, cenizas, humedad y el mas significativo, el contenido de proteína.

En la tabla 7.1 se muestra el análisis proximal de cada aislado así como de la harina de ajonjolí de la cual se partió, también se muestra el análisis de productos de soya que son tomados para su comparación.

El análisis proximal mostró que los aislados concentrados por precipitación isoeléctrica tienen un porcentaje de proteína >90%, por lo tanto cumplen el mínimo requerido para ser considerados como aislados proteicos. Los aislados concentrados por ultrafiltración no poseen dicho porcentaje aunque se acercan al



90%; esto se debe a que en el proceso de concentración se pierden péptidos por el tamaño de la membrana utilizada, lo que disminuye el contenido de proteína, lo que no ocurre en la precipitación isoelectrica.

Tabla 7.1 Composición de aislados industriales, de laboratorio y de las harinas de ajonjolí.

	<i>Harina de ajonjolí DIPASA</i>	<i>Harina de Ajonjolí Chiapas</i>	<i>Harina de Soya Desgrasada **</i>
Cenizas (%)	12.24±0.04	8.90±0.014	6.0
Grasa (%)	2.11±0.03	8.00±0.33	1.0
Proteína* (%)	43.04±0.04	44.76±2.14	53.0
Carbohidratos (%)	42.61	38.34	40
	<i>Aislado AP-PI</i>	<i>Aislado L-PI</i>	<i>Aislado de soya**</i>
Cenizas (%)	3.03	1.33±0.04	3.8
Grasa (%)	0.42	9.04±0.21	0.0
Proteína* (%)	92.80	90.48±1.57	93.0
Carbohidratos (%)	3.75	-	3.2
	<i>Aislado Sesaprot</i>	<i>Aislado L-UF</i>	
Cenizas (%)	3.61±0.03	1.55±0.03	
Grasa (%)	0.22±0.03	7.80±0.39	
Proteína* (%)	87.95±4.18	72.21±0.73	
Carbohidratos (%)	8.22	18.44	

* Factor de conversión utilizado 5.3.

**Datos tomados de Badui, 2006.

***Los datos presentados se encuentran en Base Seca en porcentaje de g componente/100 g de aislado.

El análisis proximal de las muestras se realizaron en el Laboratorio-322-323 del Edificio E de la Facultad de Química, UNAM, a excepción del aislado AP-PI la cual fue realizada por el laboratorio AQL (American Quality Laboratories México).

La comparación entre los aislados industriales y de laboratorio indica que el porcentaje de grasa es bajo en el caso de los primeros, probablemente debido a los tratamientos previos a los que fue sometida la harina para elaborar el aislado, ya que la semilla se trató con calor y se prensó por un equipo “expeller” con el fin de extraer la mayor cantidad de aceite, así como la extracción del aceite remanente con Hexano (disolvente no-polar). En el caso de los aislados obtenidos en el laboratorio el porcentaje de grasa es mucho mayor, por lo que se propone aumentar el número



de extracciones por lote para reducir el contenido de grasa, aunque estos porcentajes no se especifiquen en la norma.

Los resultados obtenidos para todos los nutrimentos se compararon con la norma del Codex (Norma del codex para productos proteínicos de soja Codex Stan 175-1989), ya que no se encontró alguna Norma Mexicana para los productos obtenidos, por lo cual se considera la norma del CODEX. En la Norma se establecen los límites en la composición de este tipo de productos; en el caso del contenido de humedad éste no deberá exceder del 10% y el contenido de cenizas no deberá ser mayor al 8%, y los valores obtenidos para los aislados están por debajo de los establecidos en la norma.

En comparación con el aislado de soja, los aislados concentrados por precipitación isoelectrica son comparables en cuanto al porcentaje de proteína. En cuanto a los demás nutrimentos, los aislados industriales tienen la misma tendencia debido al tipo de equipos utilizados y los aislados obtenidos a nivel laboratorio se encuentran por encima de estos valores.

7.3 Comportamiento de Solubilidad de proteínas en función del pH.

Las características de solubilidad que presentan los aislados comerciales y la información bibliográfica nos permitieron diseñar una metodología para la extracción de proteínas con potencial alergénico. En la figura 7.1 se muestran las curvas de solubilidad para cada aislado a valores de pH entre 2 y 12. Las dos muestras proteicas presentaron una tendencia similar, gráficas en forma de U. Se observa que la solubilidad se incrementa hacia los valores de pH extremos (2 y 12), y el mínimo de solubilidad en un intervalo de pH, entendiéndose este valor como el pH isoelectrico de las proteínas, donde el número de cargas positivas es equivalente al número de cargas negativas y al no existir repulsión entre cargas las proteínas precipitan, favoreciéndose las interacciones proteína-proteína dejando de ser solubles.

La alta disolución en condiciones de pH extremo se debe al mayor desplegamiento que las proteínas sufrieron como consecuencia de mayores cargas parciales, que incrementaron la repulsión electrostática entre aminoácidos con carga del mismo signo y entre moléculas diferentes con cargas netas mayores. Este desplegamiento incrementó a su vez la solvatación de la proteína al exponer un mayor número de residuos polares al contacto con el disolvente. De la misma manera, a valores de pH



extremo la proteína expone un mayor número de otro tipo de residuos, como es el caso de aminoácidos aromáticos.

Los valores de pH en los cuales hubo una menor solubilidad de las proteínas fueron a pH de 7 en el caso de Sesaprot® y pH entre 5 y 6 en el caso de AP-PI. Se observa un comportamiento de solubilidad distinto en las muestras entre pH 6 y 10, en el caso de AP-PI después de pH isoelectrico la solubilidad aumenta rápidamente a diferencia de Sesaprot®, lo cual nos indica que las proteínas en cada aislado son de diferente naturaleza. Esta diferencia recaerá en las propiedades funcionales de cada muestra y que junto con el porcentaje de proteína soluble permitirán proponer el sistema alimenticio al que se podrán incorporar.

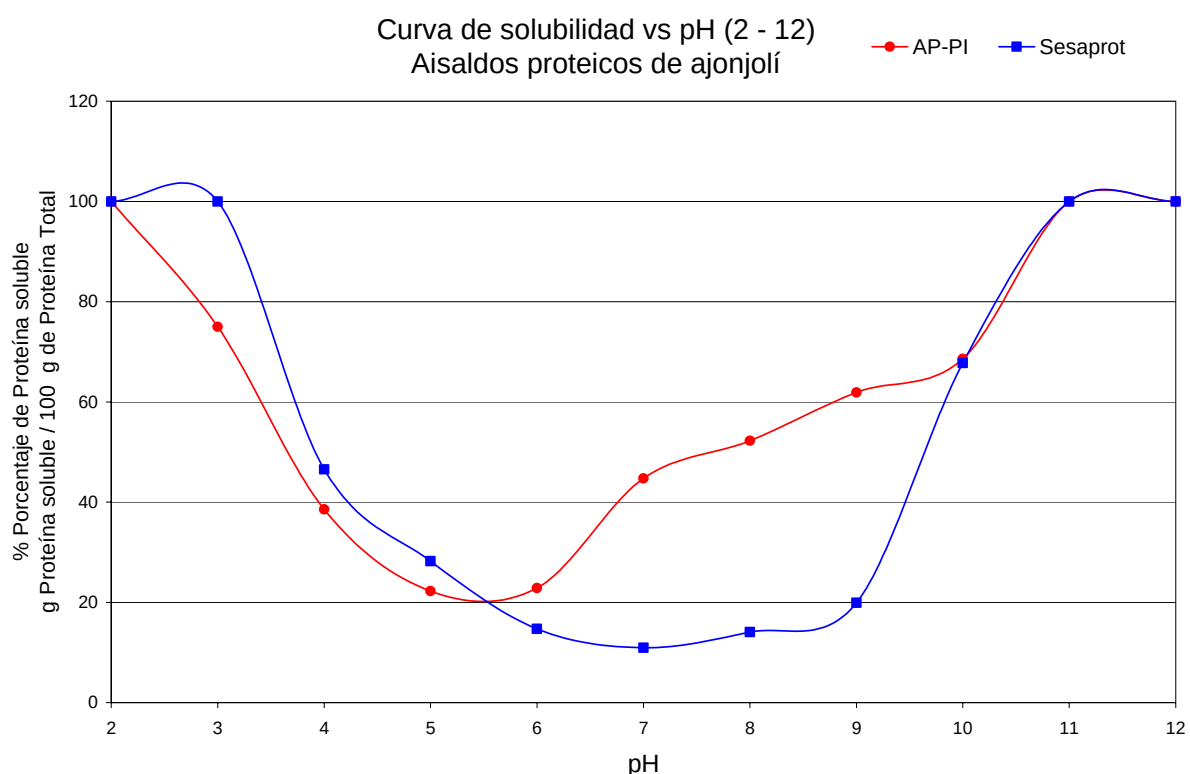


Figura 7.1 Curva de solubilidad de los aislados proteicos industriales.

Se reporta el porcentaje de proteína soluble medido mediante Lowry-SDS, la curva patrón se encuentra en el Anexo 2 y los datos de las curvas de solubilidad se encuentran en el Anexo 3 y 4. Los resultados representan el promedio de tres repeticiones.



La mayor solubilidad se presenta a pH extremos (2, 3, 11 y 12), estas condiciones ácidas y alcalinas provocan hidrólisis de las proteínas por lo que la identificación mediante geles de acrilamida se dificulta debido a que se presentan un barrido.

De acuerdo a la bibliografía (^{9, 15}) la extracción de las proteínas alergénicas se realiza entre pH 7 y 8 ya que en este pH la mayoría de las proteínas tipo albúminas son solubles, sin embargo al observar las gráficas de solubilidad notamos que en el caso del aislado proteico Sesaprot® la solubilidad se incrementa a partir del pH 10 y en el caso del aislado-PI la solubilidad se incrementa a partir del pH 7.

Por lo tanto, las condiciones que se eligieron para la extracción de proteínas alergénicas las cuales favorecen la solubilización de la mayor parte de las mismas fueron:

- Tiempo 2 hrs
- Temperatura ambiente
- pH: 8 ± 0.5
- Solvente Agua desionizada
- En agitación orbital

7.4 Perfil electroforético: proteínas de los aislados industriales y de laboratorio.

Por medio de la técnica de electroforesis se obtuvo el perfil proteico de los aislados así como de las harinas de ajonjolí. Este perfil nos mostró el tipo de proteínas que los conforman en cuanto a peso molecular y concentración de proteína y las que se conservaron después del proceso de concentración.

Para obtener el perfil electroforético se realizaron diversas diluciones de cada fracción para tener al final 100 µg de proteína en un volumen de 15 µL, a este volumen se le agregó el buffer de tratamiento de la muestra y se calentaron a 92°C por 5 minutos. Los perfiles obtenidos no se muestran debido a que la mayoría de las muestras presentaron un barrido debido a la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra.

Dentro del grupo de trabajo se sugirió realizar una precipitación previa con TCA (ácido tricloroacético) para eliminar los carbohidratos. El perfil electroforético obtenido de los geles SDS-PAGE (15% acrilamida) después de la limpieza es el mostrado en la figura 7.2.

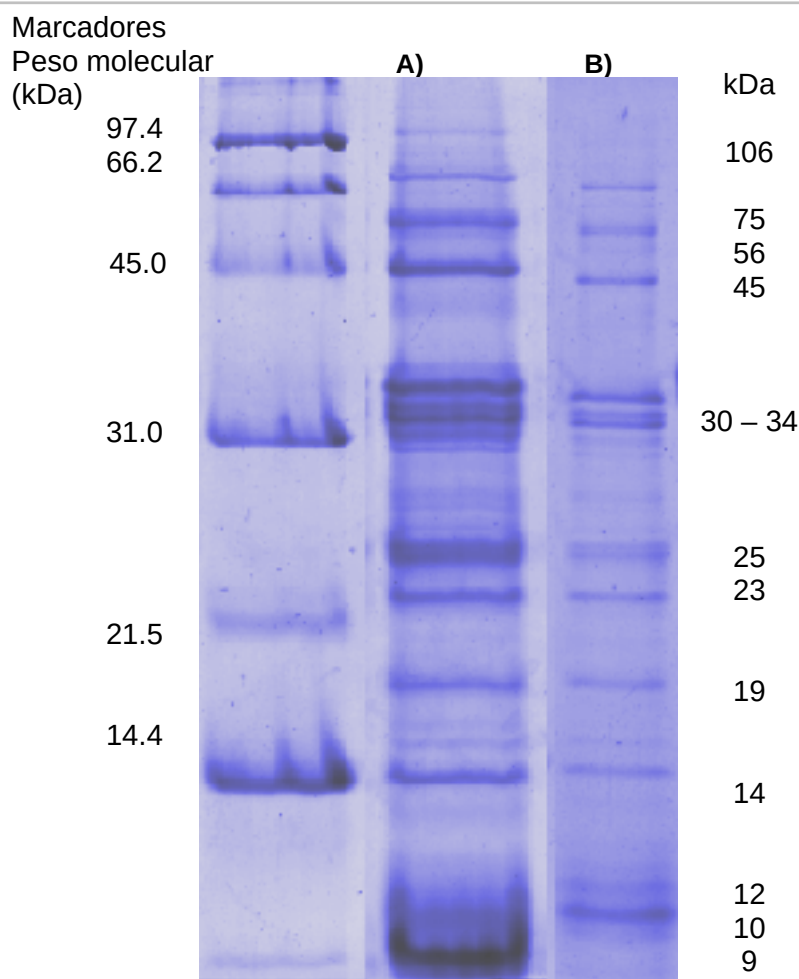


Figura 7.2 Perfil proteico Harina de Ajonjolí Chiapas. A) 200 µg proteína. B) 100 µg proteína.

El perfil proteico (*Figura 7.2*) muestra una gran cantidad de bandas con pesos moleculares que varían desde los 14 kDa hasta los 100 kDa. Se observan nueve bandas de mayor intensidad, las cuales pertenecen a la familia de albúmina y globulinas. Se observa una banda de 14 kDa que coincide con el peso molecular reportado en la bibliografía de la albúmina 2S (Ses i 2) ^(26, 2), y ciertas bandas alrededor de 10 kDa que probablemente alguna sea la correspondiente a 7kDa. También se observa la presencia de una proteína de 45kDa (Ses i 3) ⁽²⁾ que es un alérgeno menor presente en dichas semillas.

La cantidad de proteína introducida en el gel fue distinta porque se deseaba obtener una mejor resolución de las bandas, se observa que existen péptidos <14 kDa, los cuales pueden provenir de la hidrólisis de proteínas de mayor peso molecular por las condiciones alcalinas de extracción y/o se trata de proteínas de bajo peso molecular como la proteína de 7kDa.

Mediante este gel se observa que las condiciones de extracción, si solubilizan gran parte de las proteínas que conforman el aislado y que la hidrólisis es mínima o nula.



En la figura 7.3 se muestra el perfil proteico de la HA-DIPASA, donde se observa una similitud con el perfil de HA-Chiapas, sin embargo HA-DIPASA presenta una mayor concentración de las proteínas con pesos moleculares entre 54 y 42 kDa así como el triplete entre 32 - 35 kDa y la banda de 24 kDa, tal vez debido a la diversidad en las variedades de la semillas. Se observa un barrido al final de la electroforesis que nos puede indicar la presencia de peptidos muy pequeños. De igual manera se observa una banda de 14 kDa que puede tratarse de la albúmina 2S y una banda de 46 kDa similar al peso molecular de la Ses i 3.

El perfil proteico obtenido de cada muestra nos indica que la proteína alergénica puede estar presente en las harinas, y en comparación con el perfil de los aislados se mostrará de que manera afectó el proceso de concentración al contenido de proteínas.

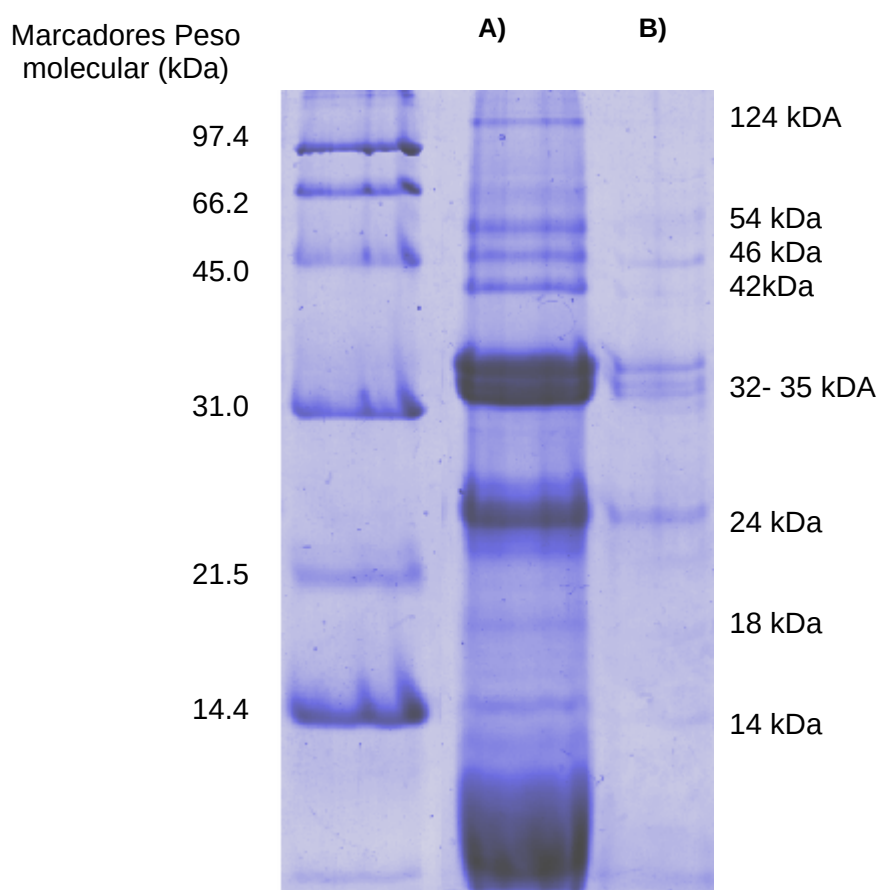


Figura 7.3 Perfil proteico HA-DIPASA. A) 200µg proteína B) 100 µg proteína.

A partir de la harina desgrasada se obtuvieron los aislados industriales y de laboratorio mediante dos métodos de concentración; precipitación isoeléctrica y ultrafiltración.



Mediante el proceso de ultrafiltración se deseaba eliminar proteínas de bajo peso molecular < 10 kDa, entre estas la proteína de 7 kDa (albúmina 2S) reportada por Tai, et al. 1999 como alergénica. Mientras que en el proceso de concentración por precipitación isoelectrica se conservarían la mayoría de los peptidos.

Los perfiles proteicos se obtuvieron realizando el mismo tratamiento con TCA. En la figura 7.4 se muestran los obtenidos para los aislados industriales.

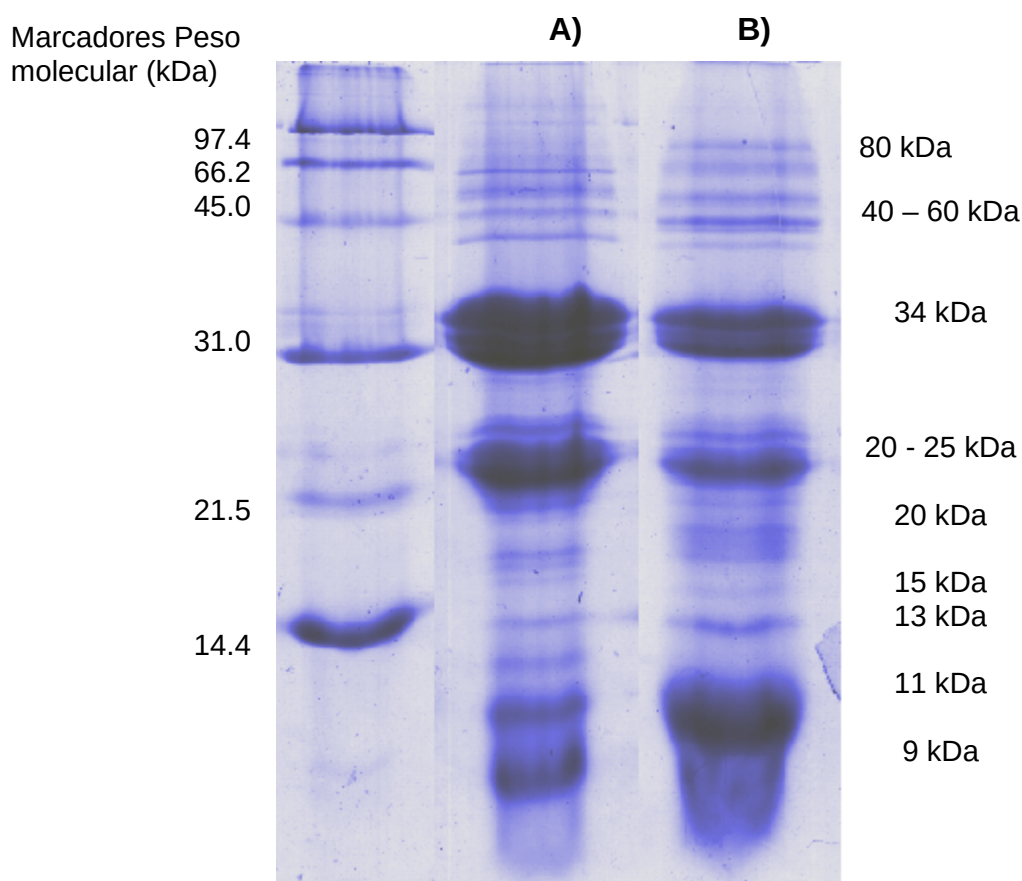


Figura 7.4 Perfil proteico de los aislados industriales. A) Sesaprot®.B) AP-PI.

El perfil proteico obtenido de ambos aislados presenta un gran número de bandas, algunas de las cuales son similares en las dos muestras. Esta diferencia nos indica que el proceso de concentración si afecta al contenido de proteínas; en el caso de AP-PI se observa una disminución en la concentración de las proteínas entre 34, 20 – 25 kDa, sin embargo otras proteínas se concentraron como lo que se observa con las proteínas de alrededor 80 kDa y la de 13 kDa. Se observa un barrido en proteínas <14 kDa debido a las condiciones alcalinas de extracción que provocaron la hidrólisis de las proteínas generando muchos peptidos y a que en el momento de



ajustar el pH para la precipitación isoelectrica se favorecieron las interacciones proteína – proteína ⁽⁵⁾ entre estos péptidos y precipitaron, debido a este barrido no se observa presencia de proteínas de peso molecular alrededor de 7 kDa.

En el caso del aislado Sesaprot® se observan bandas definidas de bajo peso molecular <14 kDa (15, 13, 11 y 9 kDa), con lo que se concluye que el proceso de ultrafiltración no reduce la cantidad de proteínas de bajo peso molecular como la albúmina 2S. Esta presencia se atribuye a que después de la extracción proteica de la harina, el sobrenadante contenía muchas partículas en suspensión las cuales taparon la membrana impidiendo la eliminación de dichos péptidos, sin embargo las proteínas muy pequeñas si lograron eliminarse por lo cual no se observa el mismo barrido que en AP-PI.

También se observa un cuádruplete con peso moleculares entre 40 y 60 kDa, un triplete de aproximadamente 34 kDa, mismos que se observan en el AP-PI y que de igual manera son característicos en las HA-DIPASA y HA-Chiapas.

Como se pudo observar el perfil proteico de los aislados industriales es similar, lo cual no concuerda con la diferencia en proteínas que se había descrito en la curva de solubilidad lo cual se puede atribuir al proceso de extracción.

Si se comparan los perfiles proteicos de la harina de ajonjolí DIPASA con los aislados industriales, estos presentan el mismo perfil proteico en cuanto a proteínas de alto de peso molecular >20 kDa, sin embargo no aplica para proteínas <20 kDa, indicando de esta manera que se concentraron las proteínas de estos pesos moleculares.

También se realizó la caracterización proteica de los aislados obtenidos a partir de la variedad *cremoso Chiapas*, se obtuvo de igual manera el perfil electroforético de las proteínas. Sin embargo para obtener una mejor resolución de las proteínas de bajo peso molecular se realizaron geles TSDS-PAGE (Tris-tricina). La figura 7.5 muestra los perfiles electroforéticos de los dos aislados en los cuales la resolución de la técnica nos permite observar bandas mas definidas y separadas.

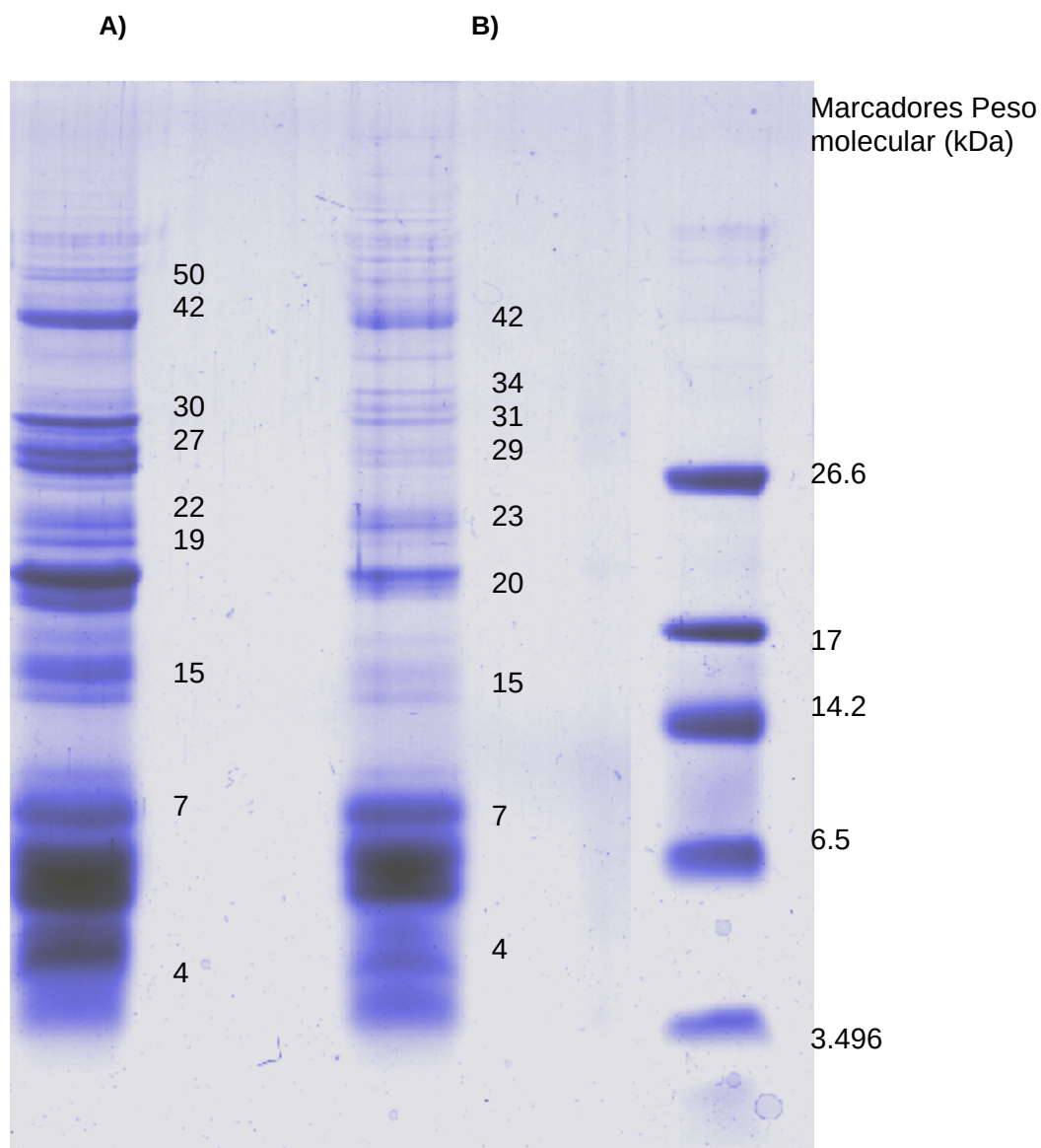


Figura 7.5 Perfil proteico de los aislados proeicos A) L-UF y B) L-PI.

En estos aislados no se observa el cuadruplete con pesos moleculares entre 40 y 70 kDa, el triplete en 30 kDa y de aprox. 20 kDa se logran observar con una mejor resolución y que en realidad están conformados por mas bandas. Por otro lado los estándares utilizados nos permiten detectar que si existen proteínas con pesos cercanos a las proteínas alergénicas (7 y 14 kDa) en los dos aislados en concentraciones diferentes, en este caso las proteínas tienen una mayor concentración en el aislado L-UF en comparación con L-PI. Esto se puede explicar ya que el proceso de ultrafiltración concentró todas las proteínas pudiendo eliminar carbohidratos y sales. De igual manera por la cantidad de sólidos totales presentes en el sobrenadante (10%) la membrana se tapó y no se eliminaron péptidos



pequeños y gracias a la técnica de tris-tricina se pudieron obtener los pesos moleculares de estas proteínas.

Se observa una proteína con peso molecular de 8 kDa, la cual es comparable con la proteína reportada por Tai, et al 1999, la albúmina 2S que por hidrólisis durante la maduración por la asparaginil-endopeptidasa se reporta con un peso molecular de 7 kDa.

La resolución obtenida mediante geles TSDS-PAGE en comparación con geles en el sistema SDS-PAGE es mejor. Ésta técnica no fue empleada en ninguno de los estudios realizados anteriormente, ya que realizaban geles SDS-PAGE (18% separador, 6% concentrador) y realizaban ensayos inmunológicos.

Comparando el perfil electroforético de los aislados industriales con los obtenidos de los aislados obtenidos de la variedad *Cremoso Chiapas* estos poseen proteínas diferentes, lo cual nos indica que la variedad influye en la naturaleza de las proteínas de las semillas, sin embargo los aislados de laboratorio presentan las bandas de bajo peso molecular que no se observan en los aislados industriales.

7.5 Secuenciación de la proteína

Por medio de los geles SDS-PAGE se detectó la presencia de proteínas con peso molecular similar al reportado de la albúmina 2S ⁽²⁸⁾. Ésta presencia se confirmó mediante secuenciación de la misma. Con este objetivo la proteína se transfirió a una membrana de PVDF (polivinil difluoruro) y posteriormente se mandó secuenciar por espectrometría de masas.

Para realizar la secuenciación se realizó un gel TSDS-PAGE con 200 µg de proteína de las cuatro muestras analizadas (AP-PI, Sesaprot ®, L-UF y L-PI), al finalizar la separación de bandas por peso molecular el gel se transfirió a una membrana de PVDF y mediante la tinción con azul de coomassie se recortaron las bandas, de peso molecular de alrededor de 14 y 7 kDa de la muestra donde se obtuvo una mejor resolución que fue de L-UF (*Figura 7.5*).

La secuenciación se realizó por espectrometría de masas (Tandem Mass Spectrometry), el resultado de esta secuenciación mostró que las bandas que se creían pertenecían a la albúmina 2S, son en realidad péptidos provenientes de la hidrólisis de la isoforma 4 de la globulina 11S ^(E) y del precursor 2 de la Globulina 11S ⁽²⁶⁾, presente en ajonjolí (*Sesamum indicum Cremoso Chiapas*). Estos resultados nos demuestran que las condiciones alcalinas de extracción provocan la



hidrólisis de las proteínas presentes en la harina de ajonjolí, incluyendo la de la albúmina 2S por lo que la detección de ésta necesita de otro tipo de ensayos como inmunológicos.

Secuencia de aminoácidos Isoforma 4 de la Globulina 11S

1 MAKLFSLLT FLLFSLSFA LRGSTWQQGQ CRIS**RNAQE** **PTRRIQAEGG**
 51 VSEFWDHNSD EFQCAGVSIH RHRLQARALM LPAYHNAPIL AYVQQGRGMY
 101 GVMISGCPET FESSQQQFEE GRGAQRFRDR HQKIGQFREG DILAFPAGAA
 151 HWAYNNGDQE LVIVVLQDNA NNANQLDPNP **RSFFLAGNPA** **GRGQEQQEYA**
 201 PQLGRKR**GQH** **QFGNVFRGFD** VQILSEVFGV **DEQAARSLQG** **ENDERGHIIT**
 251 **VARGLQVISP** **PLQREEYGRQ** EEPYGYRRD NGLLEETICSA KLRENIDKPS
 301 RADIYNPRAG RFSTINSLTL PILSFLQLSA ARGVLYRNGI MAPHWCVNAH
 351 SVIYVTRGES DMQIVSHNGQ AVFDGRVREG QVVVPQNFA VVKRAGEQGC
 401 EWVEFNTNDN ALINTLSGRT SALRGLPADV IANAYQISRE EAQRLKYSRR
 451 ETMMFSGSFR SSRERVASA

Secuencia de aminoácidos Precursor 2 de la Globulina 11S

1 MVAFKLLAL SLSLLVSAAI AQTREPRLTQ GQCRF**QRIS** **GAQPSLRIS**
 51 EGGTELWDE RQEQQFCAGI VAMRSTIRPN GLSLPNYHPS PRLVYIERGQ
 101 GLISIMVPGC AETYQVHRSQ RTMERTEASE QQDRGSVRDL HQKVHRLRQG
 151 DIVAIPSGAA HWCYNDGSED LVAVSINDVN HLSNQLDQKF RAFYLAGGVP
 201 RSGEQEQAR QTFHNIFRAF DAELLSEAFN VPQETIRRMQ SEEEEERGLIV
 251 MARERMTFVR PDEEEGEQEH RGRQLDNGLE ETFCTMKFRT NVESRREADI
 301 FSRQAGRVHV VDRNKLPIK YMDLSAEKGN LYSNALVSPD WSMTGHTIVY
 351 VTRGDAQVQV VDHNGQALMN DRVNQGEMFV VPQYYTSTAR AGNNGFEWVA
 401 FKTTGSPMRS **PLAGYTSVIR** AMPLQVITNS YQISPNQAQA LKMNRGSQSF
 451 LLSPGGRRS

Figura 7.6 Péptidos obtenidos de secuenciación.

Secuencia de la Isoforma 4 de la globulina 11S y del precursor 2 de la Globulina 11S. En letras negras y subrayadas se marcan los péptidos obtenidos de la secuenciación.

7.6 Extracción de proteínas en distintos solventes

Para conocer la naturaleza bioquímica de las proteínas del aislado concentrado por ultrafiltración así como de la harina de ajonjolí, obtenidos de la variedad *Cremoso Chiapas* se realizó la extracción de las proteínas con varios disolventes. Con base en este objetivo se realizó la extracción secuencial de las proteínas conforme a la metodología planteada en la sección 6.

Se determinó la cantidad de proteína total a las fracciones obtenidas por microKjeldhal (*Tabla 7.2*) y se realizaron geles TDSD-PAGE para obtener el perfil proteico de cada fracción.



Tabla 7.2 Proteína de las fracciones obtenidas de la extracción secuencial. El Factor de conversión utilizado 5.3. El valor mostrado es el resultado de 3 determinaciones.

Extracción	Naturaleza proteica	Aislado Ultrafiltrado	Harina de Ajonjolí
		% Proteína (g / 100 g muestra)	
Agua	Albúminas	33.09±0.50	27.42±1.34
NaCl 0.5 M	Globulinas	15.75±0.86	18.09±0.41
50% (v/v) de 1-propanol, 2% (v/v) 2-mercaptoetanol y 1% (v/v) de ácido acético	Prolaminas.	31.44±1.67	Muestra insuficiente
0.05 M de buffer de boratos pH 10, 1% (v/v) 2-mercaptoetanol y 1% (w/v) Dodecil sulfato de sodio (SDS)	Glutelinas	28.23±0.96	31.48±1.31

De la tabla anterior se observa en el caso de la muestra L-UF que la mayor cantidad de proteína extraída está en la fracción acuosa correspondiente a las albúminas, seguida de la fracción alcohólica correspondiente a la fracción de prolaminas y de la fracción salinas referente a las globulinas, por último la fracción glutelinica; por lo que las albúminas conforman la mayoría de las proteínas de este aislado.

El perfil electroforético se realizó introduciendo al gel 200 µg de proteína después de haber tratado la muestra con urea; se observa la presencia de las mismas proteínas en todas las fracciones en distintas concentraciones. En la fracción acuosa están tres bandas intensas en un peso molecular aproximado a 27 kDa y una banda en 17 kDa. Estas bandas se repiten en las demás fracciones siendo menos intensas en la fracción alcohólica seguida de la fracción en buffer de boratos y por último en la fracción salina, siendo estas proteínas las más abundantes en el aislado. En algunos casos se observan bandas que no se encuentran en otras fracciones, tal es el caso de las proteínas de 48, 56 y 66 kDa presente en la fracción de Buffer de Boratos. Por lo tanto se observan proteínas que solamente son solubles en ciertos solventes.

La fracción glutelinica es la que presenta una mayor cantidad de bandas, de estas la mayoría están presentes en las demás fracciones, sin embargo se observan dos proteínas una de 25 kDa y otra de 16 kDa las cuales son características de esta fracción.



En el caso de HA-Chiapas, la mayoría de las proteínas se solubilizaron en la mezcla de buffer de boratos, lo cual indicaría que predominan las glutelinas, sin embargo la fracción de albúminas presenta una mayor intensidad de las mismas bandas presentes en el perfil del aislado L-UF.

En la figura 7.8 se muestran los perfiles proteicos de HA-Chiapas, donde se observa que las extracciones realizadas con mezcla de 1-propanol y el buffer de boratos presentaron un barrido atribuido al tipo de solventes utilizados, este barrido nos impide definir con claridad las bandas de peso molecular bajo, sin embargo se logran observar bandas que nos muestran la diferencia de proteínas extraídas en cada solvente.

En el caso de las proteínas solubles en agua, clasificadas dentro de la familia de las albúminas, se observa la presencia de proteínas de 17 y 21- 32 kDa que predominan en esta fracción; así como proteínas de alrededor 14 kDa. Según la clasificación realizada por Osborne en 1924, las proteínas que se podían clasificar en cuatro grupos de acuerdo a su solubilidad en varios solventes, sin embargo esto no se aplica en el caso de las proteínas de ajonjolí porque las proteínas de 17 y 21- 32 kDa se observan de igual manera en las demás fracciones en menores concentraciones.

A pesar de que en todas las fracciones se observa un perfil proteico similar, en algunos casos se observan bandas que no se encuentran en otras fracciones, tal es el caso del triplete de 48 kDa y proteínas <14 kDa en la fracción acuosa y las proteínas de 56 kDa en la fracción de Buffer de Boratos, por lo que estas proteínas son características de cada fracción.

Cabe señalar que en el caso del L-UF después de la última extracción no quedó ningún precipitado, indicando de esta manera que todas las proteínas se encuentran distribuidas en cada fracción, contrario a lo presentado en la HA-Chiapas donde al final se obtuvo un precipitado que son carbohidratos presentes en el harina.

Comparando los perfiles electroforéticos la proporción de cada fracción en las dos muestras es la misma, lo que nos indica que se conserva la proporción de las proteínas.

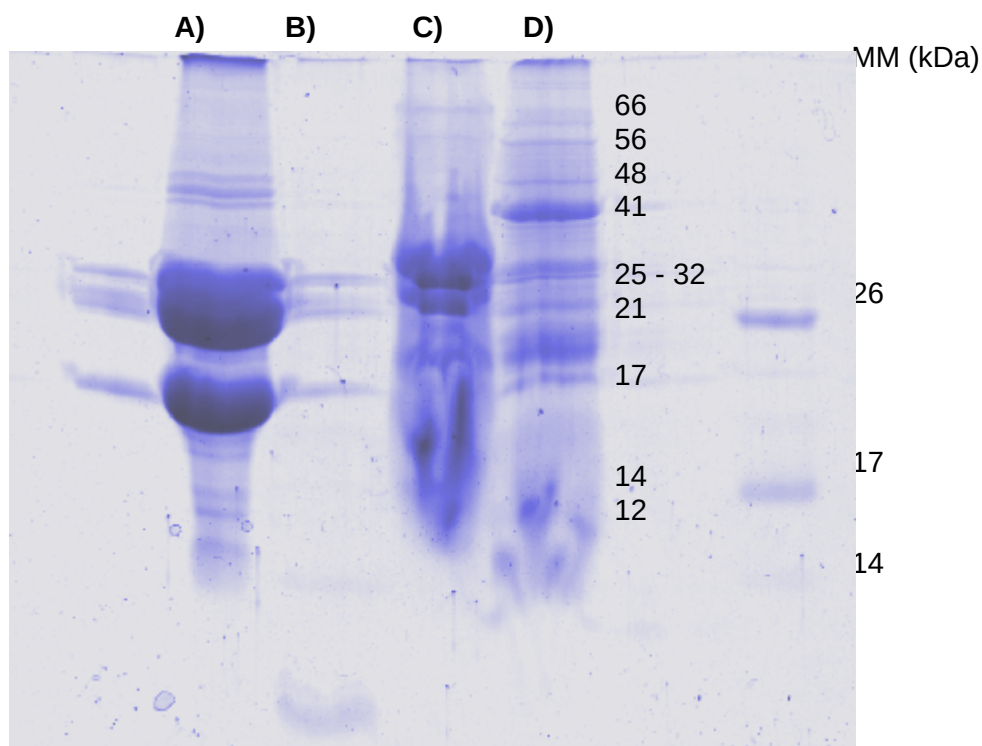


Figura 7.7 Perfil electroforético, extracción secuencial de HA-Chiapas. Los solventes utilizados A) Agua B) NaCl 0.5 M C) 1-Propanol D) Buffer de Boratos.

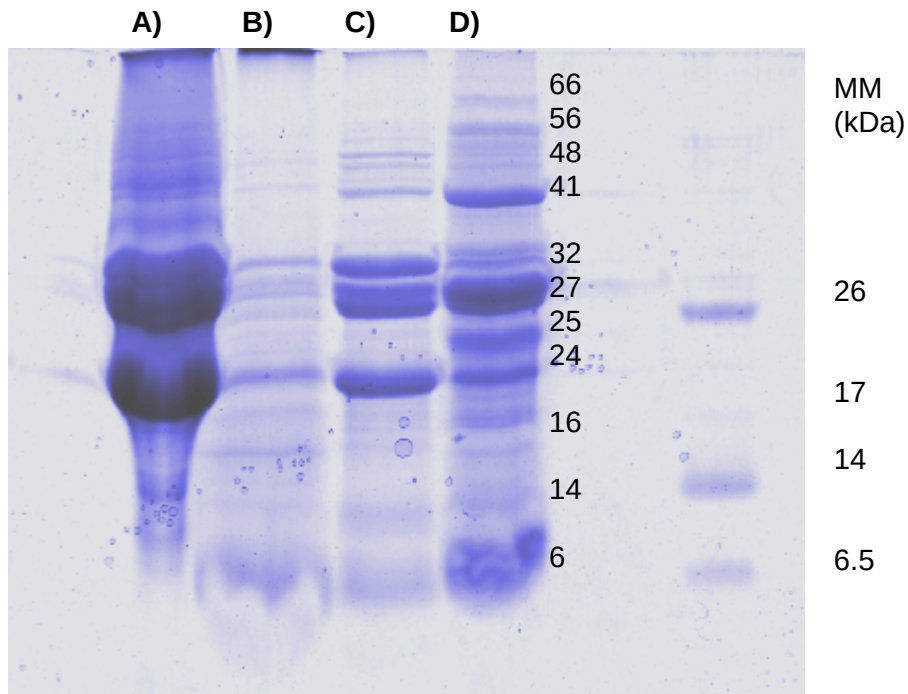


Figura 7.8 Perfil electroforético, extracción secuencial de L-UF. Los solventes utilizados A) Agua B) NaCl 0.5 M C) 1-Propanol D) Buffer de Boratos.



8. Conclusiones

- El sistema de obtención de aislado proteico por precipitación isoeléctrica permite obtener un mayor rendimiento y concentración de proteína que el de ultrafiltración. Esto se verificó por la obtención de dos aislados a partir de la variedad *Cremoso Chiapas*.
- A nivel laboratorio la metodología de extracción de la grasa no es la adecuada pues se retiene mayor cantidad de grasa.
- Mediante el comportamiento de solubilidad se estableció la metodología para determinar la presencia de proteínas alergénicas en los aislados. Las condiciones son pH de extracción que se encuentra entre 8 ± 5 a temperatura ambiente, en agitación orbital con agua desionizada.
- El análisis electroforético se debe realizar en geles de Tris-Tricina el cual nos permite obtener una mejor resolución de las bandas de bajo peso molecular.
- Mediante geles TSDS-PAGE se visualizan proteínas de peso molecular alrededor de 14 y 7 kDa que sugerirían la presencia de la albúmina 2S.
- La presencia de la albúmina 2S se descarta ya que la secuenciación de dichas bandas mostró que estas proteínas de bajo peso molecular pertenecen a la isoforma 4 y precursor 2 de la Globulina 11S presente en semillas de ajonjolí.
- La proteína Ses i 1 (14 kDa) puede no estar presente en estas variedades o puede haberse perdido por los métodos de preparación del aislado, pero puede ocurrir también que las condiciones alcalinas de extracción de las proteínas a partir de la harina de ajonjolí puedan haber hidrolizado las proteínas, por lo que la albúmina 2S se encuentra hidrolizada en péptidos de menor tamaño.
- El método de identificación de un alérgeno por su peso molecular y naturaleza bioquímica no es suficiente para su detección por lo que se propone realizar una identificación mas detallada mediante ensayos inmunológicos y así detectar la presencia de los epítopes causantes de alergia.



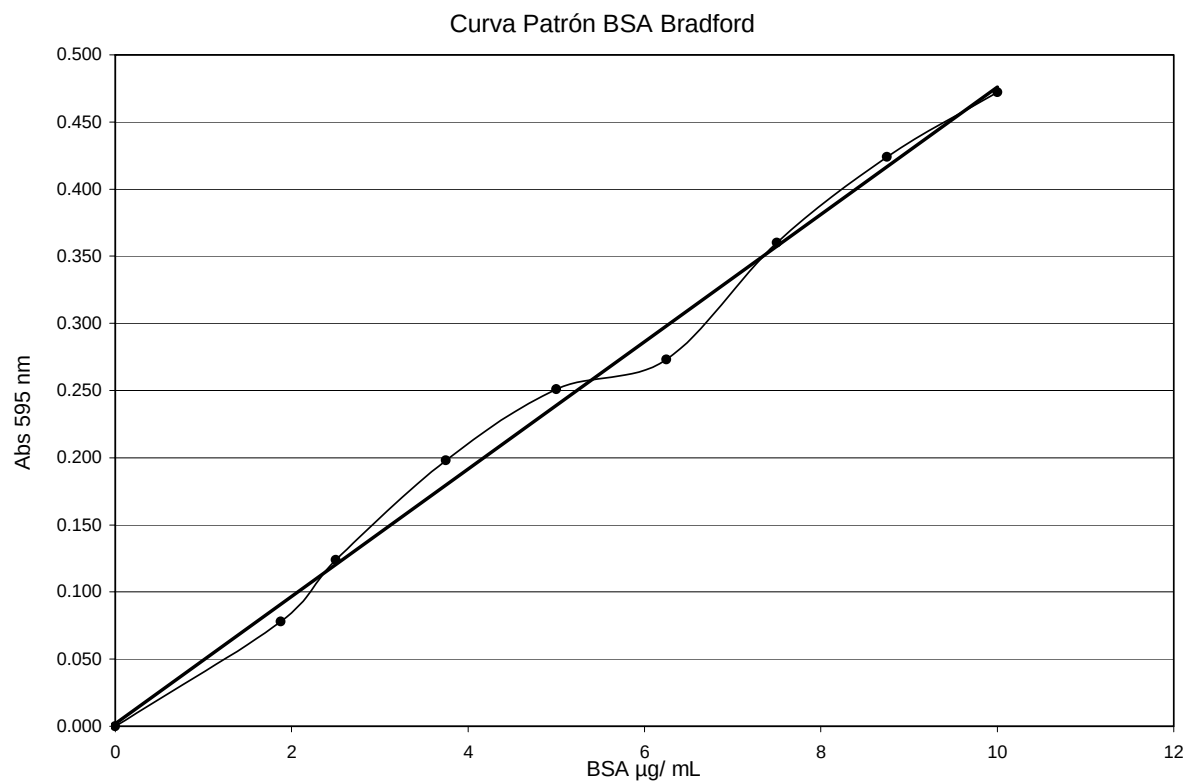
Anexo 1

Cuantificación de proteína por el método de Bradford

Curva Patrón

La curva patrón se realizó con albúmina sérica bovina en un intervalo de 1.2 a 10 $\mu\text{g/mL}$ de proteína soluble. Se partió pesando la cantidad necesaria de albúmina sérica bovina (SIGMA) para obtener una solución con una concentración de $1.40 \pm 0.2 \text{ mg/mL}$. Esta solución Stock se diluyó 1:1 con agua destilada para obtener una concentración de 0.70 mg/mL . Se tomó una alícuota de $178 \mu\text{L}$ y se aforó a 10 mL con agua destilada, obteniendo la solución A con una concentración final de $12.5 \mu\text{g/mL}$ de proteína soluble. Con la solución A se realizan las siguientes diluciones para tener un volumen final de $800 \mu\text{L}$ y se agregan $200 \mu\text{L}$ del reactivo Bio-Rad para tener un volumen final de 1 mL. Se mezclan los reactivos en celdas de volumen reducido ($V_f = 1$), esperar 5 minutos y medir la absorbancia a 595 nm.

No. Tubo	Reactivo Bio-Rad (μL)	Agua destilada (μL)	Solución A ABS (μL)	Concentración de proteína ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia 595 nm
0	200 μL	800	0	0	0.000
1		650	150	1.875	0.078
2		600	200	2.5	0.124
3		500	300	3.750	0.198
4		400	400	5	0.251
5		300	500	6.250	0.273
6		200	600	7.5	0.360
7		100	700	8.750	0.424
8		0	800	10	0.472



De esta curva patrón se obtuvo lo siguiente ecuación de la recta

$$\text{Abs (595 nm)} = 0.0474 (\text{Proteína } \mu\text{g/mL}) + 0.0019$$

$$\text{Proteína } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Abs (595 nm)} - 0.0019}{0.0474}$$



Anexo 2

Cuantificación de proteína por el método de Lowry modificado (Lowry-SDS)

Curva patrón

Para realizar la curva patrón se pesó la cantidad necesaria de Albúmina Sérica Bovina (ABS) para tener una concentración de 1 mg/mL, y se debe hacer una dilución 1:10 para obtener la solución estándar proteína de 0.1mg/mL. La determinación se realizó por triplicado.

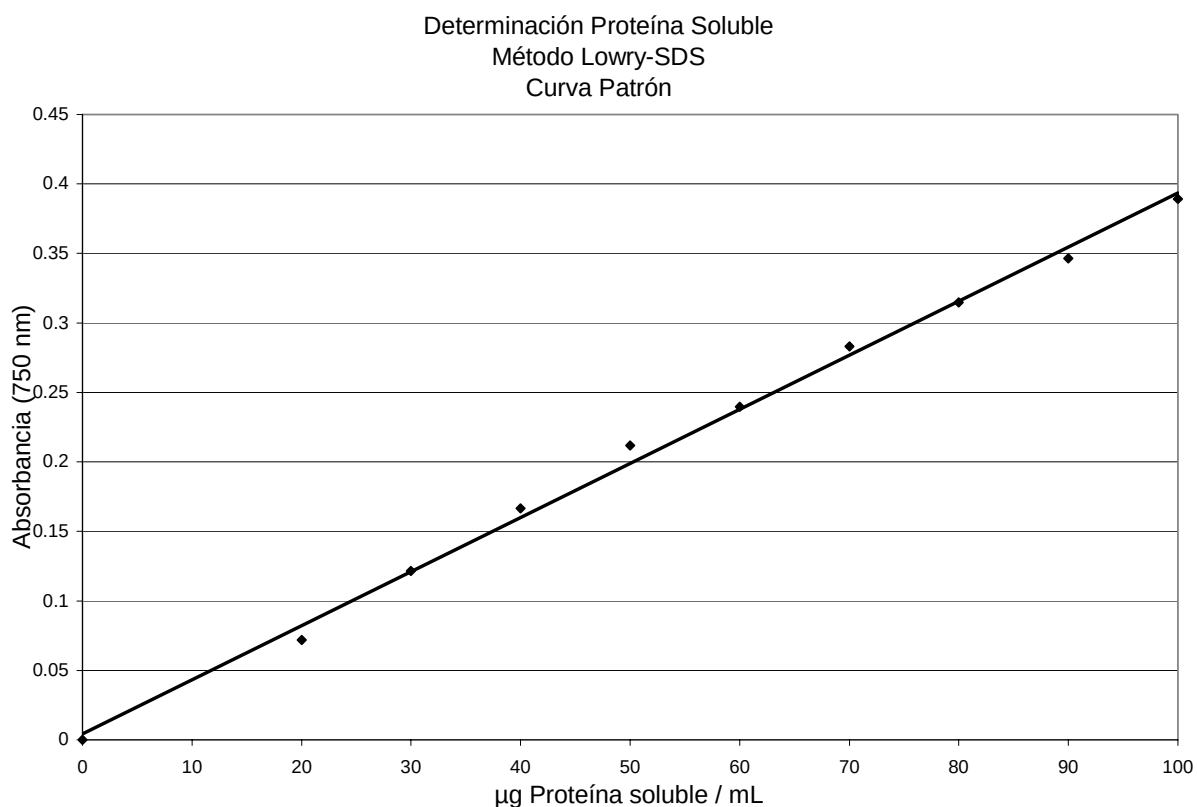
No. Tubo	Agua destilada (mL)	Solución ABS (0.1mg/mL) (mL)	Concentración de proteína (µg/mL)
1	1	0	Blanco
2	0.9	0.1	10
3	0.8	0.2	20
4	0.7	0.3	30
5	0.6	0.4	40
6	0.5	0.5	50
7	0.4	0.6	60
8	0.3	0.7	70
9	0.2	0.8	80
10	0.1	0.9	90
11	0	1.0	100

Soluciones

- **CTC** (Carbonato de sodio 10%, Tartrato de potasio 0.2%, Sulfato de cobre.5H₂O 0.1%)
- **NaOH** 0.8 M
- **Dodecil Sulfato de Sodio** (SDS) 10%
- **Solución A:** Se mezclaron volúmenes iguales de las siguientes soluciones y en el mismo orden: CTC, NaOH y SDS.
- **Solución B:** Reactivo de Folin-Ciocalteu-Fenol (SIGMA). Realizar una dilución 1:6. Se preparó antes de desarrollar la determinación.



El volumen final fue de 1 mL. Con agitación continua se agregaron a cada tubo 1 mL de la solución A y se dejó reposar 10 minutos a temperatura 24°C. Al término de estos 10 minutos, se le agregó a cada tubo 0.5 mL de la solución B con agitación continua y se dejó desarrollar la reacción durante 30 minutos. Pasado este tiempo se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Milton Roy Modelo Espectronic 21D.



De esta curva patrón se obtuvo la siguiente ecuación de la recta

$$\text{Abs (595 nm)} = 0.0039 (\text{Proteína } \mu\text{g/mL}) + 0.0042$$

$$\text{Proteína } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Abs (595 nm)} - 0.0042}{0.0039}$$

**Anexo 3****Curva de solubilidad (Sesaprot ®)**

pH	Promedio µg Proteína/mL	Desv. Std	Coef. Var	g Proteína soluble /100g muestra
2	17109.09	104.15	0.609	100.000
3	13790.91	39.36	0.285	100.000
4	5086.36	118.09	2.322	46.522
5	3086.36	39.36	1.275	28.229
6	1609.09	68.18	4.237	14.717
7	1200.00	68.18	5.682	10.976
8	1540.91	68.18	4.425	14.094
9	2177.27	78.73	3.616	19.914
10	7404.55	118.09	1.595	67.725
11	14177.27	104.15	0.735	100.000
12	13472.73	312.45	2.319	100.000

Anexo 3 - Tabla 1 Curva de solubilidad en función del pH de Sesaprot ®. En la tabla se muestra el porcentaje de proteína.

**Anexo 4****Curva de solubilidad en función del pH (AP-PI)**

pH	Promedio	Desv. Std	Coef. Var	g Proteína soluble /100g muestra
2	13651.28	235.00	1.721	100.00
3	7497.44	235.00	3.134	69.59
4	3858.12	103.63	2.686	35.81
5	2225.64	44.41	1.995	20.66
6	2285.47	39.17	1.714	21.21
7	4473.50	82.42	1.843	41.52
8	5225.64	76.92	1.472	48.50
9	6191.45	64.53	1.042	57.47
10	6858.12	82.42	1.202	63.66
11	13471.79	582.45	4.323	100.00
12	17317.95	247.27	1.428	100.00

Anexo 4 - Tabla 1 Curva de solubilidad en función del pH del aislado proteico PI. En la tabla se muestra el porcentaje de proteína.



9. Referencias

- 1) Badui D. S. (2006). Química de Alimentos. Ed. Pearson. 4ª Edición. México.
- 2) Beyer K, Bardina L, Grishina G, Sampson H.A. (2002) Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage proteins as common food allergens. Journal Allergy Clinical Immunology. 110(1), 154-159.
- 3) Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Annals Biochemistry. 72:248-254.
- 4) Breiteneder H., Mills C. (2005). Plant food allergens – structural and functional aspects of allergenicity. Biotechnology advances. 23:395-399.
- 5) Cheftel J. C., Cuq J. L., Lorient D. (1989). Proteínas alimentarias, Ed. Acricibia S. A.; Zaragoza, España.
- 6) Desai B., Kotecha M. y Salunkhe K. (1997). Seeds Handbook. Biology, Production, Processing and Storage. Marcel Dekker. N. Y. pag 226.
- 7) Hara-Hishimura I, Takeuchi Y., Inoue K., Nishimura M. (1993). Vesicle transport and processing of the precursor to 2S albumin in pumpkin. The plant Journal. 4(5):793-800.
- 8) Hefle S. (1996). The chemistry and biology of food allergens. Food Techonolgy. Marzo.
- 9) Javier F, Maldonado B, Wellner N, Mills Claire. (2005). Thermostability and in vitro digestibility of a purified major allergen 2S albumin (Ses i 1) from white sesame seeds (Sesamum indicum L.). Biochimica et Biophysica Acta. 1752:142–153.
- 10)Khalid E, Babiker E, Tinay A. (2003). Solubility and functional properties of sesame seed proteins as influenced by pH and/or salt concentration. Food Chemistry, 82:361-366.
- 11)Kinsella J, Mohite R. (1985). New Protein Foods. Academic Press. Vol 5. pag. 435-455. U.S.A.
- 12)Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.



- 13) López G, Flores I, Gálvez A, Quirasco M, Farrés A. (2003) Development of a liquid nutritional supplement using a *Sesamum indicum* L. protein isolate. Swiss Society of food Science and Technology, 36, 67-74.
- 14) Mills E.N.C., Madsen C, Shewry P, Wichers H. (2003). Food allergens of plant origin –their molecular and evolutionary relationships. Food Science and Techonology. 14:145-146.
- 15) Pastorello E, Varin E, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C. (2001). The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin. Journal of Chromatography B. 756:85-93.
- 16) Peterson G. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et. al. which is more generally applicable. Annal Biochemn, 83:346.
- 17) Popineau Y, Bollecker S, Thebaudin J. (1988). Caractérisation biochimique et fonctionnelle des protéins de gluten désamidées partiellement en conditions ménagées. Sciences des aliments. 8(4):411-430.
- 18) Psczola Donald E. (2004). Ingredients. Food Technology. 58; 2: 56-69.
- 19) Rivero de P. M. (1983). Some functional and utilization characteristics of sesame flour and proteins. Journal of Food Science. 48:1145-1147.
- 20) Robbelen G. (1989). Oil crops of the world. McGRaw Hill. U.S.A.
- 21) Saad R, Pérez C. (1984). Functional and nutritional properties of modified proteins of sesame (*Sesamum indicum*, L.) Arch. Latinoamerican Nutrition. 34(4):749-762.
- 22) Schägger H, Von Jagow G. (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electroforesis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry. 166:368-379.
- 23) Smith A. K, Circle S. J. (1972). Soybeans: Chemistry and Technology. Ed Avi. U.S.A.
- 24) Shewry P, Napier J, Tatham A. (1995). Seed storage proteins: structures and biosynthesis. The plant cell. Vol 7:945-956.
- 25) Shewry P, Franklin J, Parmar S, Smith S. (1983). The effects of sulphur starvation on the amino acid and protein compositions of barley grain. Journal of cereal science. 1:21-31.
- 26) Tai S, Wu L, Chen E, Tzen J. (1999). Molecular cloning of 11S globulin and 2S albumin, the two major seed storage proteins in sesame. Journal of Agricultural Food Chemistry. 47:4932-4938.



- 27) Tai S, Lee T, Tsai C, Yiu T-J, Tzen J. (2001). Expression pattern and deposition of three storage proteins, 11S globulin, 2S albumin and 7S globulin in maturing sesame seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*. 39:981–992.
- 28) Wolff N, Cogan U, Admon A, Dalal I, Katz Y, Hodos N, Karin N, Yannai S. (2003). Allergy to sesame in humans is associated primarily with IgE antibody to a 14 kDa 2S albumin precursor. *Food and Chemical Toxicology*. 41:1165-1174.
- 29) Wolff N, Yannai S, Karin N, Levy Y, Reifen R, Dalal I, Cogan U. (2004). Identification and characterization of linear B-cell epitopes of β -globulin, a major allergen of sesame seeds. *American Academy of Allergy, Asthma and Immunology*. 1151-1158.
- 30) Zayas J. F. (1994). VII.2 Corn Germ Protein: Functional properties in a model system and in food products. *Biotech in Agriculture and Forestry*; Num 25, 513-535.



9.1 Referencias en la WEB

A) Guía técnica del ajonjolí

<http://www.agronegocios.gob.sv/comoproducir/guias/ajonjoli.pdf>.

B) Ajonjolí, generalidades.

<http://www.bcn.gob.ni/estadisticas/exterior/19.pdf>

C) Distribuidora Internacional de productos agrícolas S. A. de C. V.

www.dipasa.com

D) pET System Manual

http://www.fhcrc.org/science/labs/hahn/methods/biochem_meth/pet.pdf%20-/science/labs/hahn/methods/biochem%20meth/pet.pdf

E) Secuencia de la Globulina 11S isoforma 4

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=81238594>