

Nota Técnica

Digestibilidad gástrica y duodenal in vitro de aislados proteicos del huevo de codorniz

In vitro gastric and duodenal digestibility of protein isolates from quail egg

Alejandra Barrionuevo¹; Jessica Cornelio¹; Cecilio Barba Capote²; Cynthia Ramos³

¹ Universidad Estatal de Bolívar. Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador - abarrionuevo@ueb.edu.ec

² Universidad de Córdoba, Av. de Medina Azahara, 5, 14071 Córdoba- España.- cjbarba@uco.es

³ Clínica Veterinaria Puppy Planet, Alfredo Pareja Diezcanseco s/n y Av. Víctor Hugo-Ambato-Ecuador: clinicavetpuppyplanet08@gmail.com, cynthiaramosmvz@gmail.com.

Rec.: 22.07.2021 Acept.: 03.10.2021

Publicado el 30 de diciembre de 2021

Resumen

Aislamos la proteína por su punto isoeléctrico, cuantificar, caracterizar y someterlas a estudios de digestión in vitro. Tomando en cuenta 4 tipos de muestras para comprobar, a medida que pase el tiempo las proteínas se conservan o se pierden. Huevos recolectados a las 12 horas después de la postura mostraron que poseían un valor proteico de 87.22%, huevos de 24 horas 87,80%, huevos de 48 horas 86.26% y huevos 72 horas recolectados después de la postura 90.28%, demostrándonos que el huevo de codorniz tiene un alto valor proteico comparado con el huevo de gallina. En la caracterización proteica a través de electroforesis SDS-PAGE, pudimos evaluar los tipos de proteína que este producto posee tomando en cuenta que se aisló lisozima y ovomucina por lo que en este estudio sus bandas casi son inexistente. Ovotransferrina (77kDa), Avidin (65-69ka), Ovoglobulina G3 (50-55 kDa), Ovoalbúmina (39 kDa) y fracciones de Lisozima (12kDa), observadas en todas las muestras estudiadas por ende estas proteínas se conservan si no son sometidas a cambios bruscos de temperatura mayores de 50°C y menores de 25°C. Por lo tanto para la simulación del proceso gastrointestinal in vitro se utilizaron enzimas como la pepsina, pancreatina y sales biliares, preparándolas a distintos pHs y simular el estómago de una persona que padece problemas gastrointestinales pH 1.2 estómago de una persona adulta sana pH 2.0 y niño no lactante pH 3.2; determinamos que las proteínas del huevo de codorniz son totalmente digeridas a pH 1.2 y a pH 3.2 la proteína ovotransferrina y ovoalbúmina presentan inconvenientes para su digerido total.

Palabras claves: Digestión in vitro, Electroforesis SDS-PAGE, Proteínas,

Abstract

We isolate the protein by its isoelectric point, quantify, characterize and subject them to in vitro digestion studies. Taking into account 4 types of samples to check as time passes the proteins are preserved or lost. Eggs collected at 12 hours after laying showed that they had a protein content of 87.22%, eggs collected at 24 hours after laying 87.80%, eggs collected at 48 hours after laying 86.26 % and eggs collected at 72 hours after laying 90.28% showing that the quail egg has a high protein value compared to the chicken egg. In the protein characterization through SDS-PAGE electrophoresis, we were able to evaluate the types of protein that this product has taking into account that lysozyme and ovomucine were isolated, so in this study their bands are almost non-existent. Ovotransferrin (77kDa), Avidin 65-69ka, Ovoglobulin G3 (50-55 kDa), Ovalbumin (39 kDa) and Lysozyme fractions (12kDa), observed in all the samples studied, therefore these proteins are conserved if they are not subjected to Sudden temperature changes greater than 50 ° C and less than 25 ° C. Therefore, for the simulation of the gastrointestinal process in vitro enzymes such as pepsin, pancreatin and bile salts were used, preparing them at different pHs and simulating the stomach of a person suffering from gastrointestinal problems pH 1.2 stomach of a healthy adult person pH2, 0 and non-infant child pH3,2; We determined that quail egg proteins are fully digested at pH 1.2 and at pH 3.2, ovotransferrin and ovalbumin protein have problems for their total digestion.

Keywords: In vitro digestion, Proteins SDS-PAGE Electrophoresis

Introducción

El huevo es una de las mejores y más económicas fuentes de proteína de alta calidad conteniendo un balance equilibrado de los distintos minerales y vitaminas, la incorporación de huevos en la dieta humana provee de los nueve aminoácidos esenciales, haciendo de estos una excelente fuente de aminoácidos esenciales; las proteínas del huevo se han convertido en una de las fuentes principales para la obtención de péptidos bioactivos. Los péptidos bioactivos son secuencias específicas de aminoácidos, inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática (López, 2014).

El proceso de digestibilidad de alimentos es uno de los parámetros más empleados para determinar la calidad de las proteínas. Para evaluar la calidad de la proteína existen diversos métodos que se pueden clasificar en químicos, biológicos y microbiológicos generalmente uno de los métodos que se aplica en la evaluación del grado de digestibilidad de las proteínas es el enzimático, ensayo basado en crear un medio muy similar al de los organismos de las personas con una mezcla de enzimas y sales biliares. Los hidrolizados proteicos juegan un papel importante en el proceso de digestión. (Quinteros, 2016).

En esta Investigación se Caracterizó molecularmente la digestibilidad *in vitro* de aislados proteicos del huevo de codorniz, extrajo la proteína de albumen de huevo de codorniz mediante su punto isoeléctrico, cuantificó el contenido de proteína con el método Analizador elemental, caracterizó el perfil proteico de los aislados mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE y establecieron las diferencias y relaciones entre las muestras de acuerdo al tiempo de recolección después de la postura.

Materiales y métodos

Factor en estudio, análisis de los datos y variables evaluadas

En la investigación se utilizaron 80 huevo de codorniz, en diferentes horas de recolección después de la postura: 12 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas. El análisis de los datos se lo realizó a través de estadística descriptiva según el siguiente detalle: Mínimas = Min; Máximas = Max; Media =U; Prueba de Fisher; Prueba de Tukey

Extracción de albumen (EXT ALBM) fue evaluado utilizando albumen huevos de codorniz

de cada tiempo de recolección. Peso del albumen centrifugado (PAC) después que el albumen fue centrifugado, el sobrenadante fue colocado en vasos herméticos y pesados en una balanza analítica. Peso del albumen liofilizado (PAL) fue tomado después de que las muestras salieron del equipo de liofilización, las cuales se pesaron en una balanza analítica. Análisis elemental (AE) esta variable fue registrada utilizando un analizador elemental y sus datos fueron expresados en porcentaje de nitrógeno (%N). Cuantificación proteica por analizador elemental (CPAE) se evaluó el porcentaje de nitrógeno obtenido en el analizador elemental y para obtener el porcentaje de proteína (%P) se utilizó la fórmula 1. Porcentaje de rendimiento (%R) se evaluó en relación al peso del albumen centrifugado (Wf) con el albumen liofilizado (Wi) para lo cual se utilizó la fórmula 2. Electroforesis (SDS-PAGE) se determinó con 20 g de proteína liofilizada por muestra, utilizando un equipo de electroforesis. Digestibilidad gástrica *in vitro* (DGIV) se la realizó tomando 10 mg de albumen liofilizado por cada muestra, añadiendo pepsina y simulador de fluido gástrico sometido a los pH 1.2; 2.0; 3.2 para obtener la proteína digerida y sus datos fueron evaluados mediante electroforesis. Digestibilidad duodenal *in vitro* (DDIV) se evaluó de los resultados de la digestión gástrica, por cada muestra, añadiendo pancreatina y simulador de fluido gástrico duodenal con pH 7.0 y sus datos son evaluados mediante electroforesis.

$$\%P = 6.68 * \%N \quad (1)$$

$$\%R = Wf/Wi * 100 \quad (2)$$

Manejo del experimento

Selección de los huevos

Se tomaron directamente del galpón de producción de las codornices en donde dependiendo del tiempo de recolección los huevos serán tomados al azar colocándolos en una canastilla para que los huevos no se estropeen, se los llevo con mucho cuidado evitando factores que alteren sus componentes.

Extracción de proteína de albumen de huevo de codorniz mediante su punto isoeléctrico

Se obtuvo mediante el método descrito por Carrillo *et al.* (2016), con modificaciones según el detalle descrito a continuación: **1.** Se extrajo aproximadamente 90 ml de clara de 20 huevos; **2.** Tomamos 90 ml de clara de huevo tratado con etanol al 30% en una relación 1.1 respectivamente, se ajustó a pH 5.8 con la solución de HCl y agitamos la muestra a 500rpm/15min para separar la mucina; **3.** La mezcla

fue llevada a centrifugar a 4°C durante 30 minutos a 4.500rpm; 4. Se descartó el precipitado y se trabajó con el sobrenadante; 5. El sobrenadante quedo en reposo durante 3 días en el ultracongelador marca Panasonic a -80°C con la finalidad de precipitar las proteínas; 6. Para el proceso de liofilización de las muestras se trabajó bajo condiciones estándares del equipo de liofilización marca CHRIST modelo ALPA1-4Dplus.

Cuantificación proteica mediante Analizador elemental

Del material liofilizado se tomó 20 mg aproximadamente de muestra liofilizada, colocándolo en canastillas de papel aluminio, se comprimió en un pelletizador donde se obtuvo una pastilla la cual fue colocada en una gradilla numerada; 2. Colocamos las pastillas contenidas con las muestras en el carrusel del analizador elemental en el número que corresponda y obtuvimos los resultados en porcentajes de nitrógeno.

Caracterización del perfil proteico de los aislados mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE

Se empleó la técnica analítica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Utilizando el método descrito por Laemmli (1970) con modificaciones, la cual será descrita a continuación:

1. Se preparó geles de 1 mm de espesor, en donde el gel separador será preparado al 12% y el gel concentrador al 4% de solución acrilamida.

Preparación gel separador 12%

Se utilizó agua destilado 1.425ml, Tris 1M HCl pH 8.8 3ml, Acrilamida 30% 3ml, SDS10% 75ul, Temed 9ul, PSA10% 30ul. 29

Preparación de gel concentrador 4%

1.- Se utilizó agua destilado 2.2ml, Tris 1.5M HCl pH 6.8 0.42ml, Acrilamida 30% 0.7ul, SDS10% 75ul, Temed 6ul, PSA10% 20ul; 2.- Se colocó el peine para generar los pocillos; 3.- Preparación de las muestras; 4.- Se pesó 10 mg de proteínas aisladas de los mejores tratamientos; 5.- Se añadió 1 ml de agua y se mezclaron en el vortex VWR.; 6.- Se tomó 200 µL y se mezcló con 200 µL de buffer de muestra; 7.- Se llevó las muestras a una temperatura de 90 °C durante 5 minutos en un termo agitador marca Ivymen TR100-G; 8.- Una vez gelificado, el gel fue trasladado a la cámara electroforética donde se puso 10 µL de la muestra y 10 µL del estándar en los respectivos pocillos formados por el peine; 9.- La cámara fue llenada con la solución del buffer running; 10.- La separación electroforética se realizó bajo influencia de un campo eléctrico con un voltaje de 200 Vv con 50mA y un tiempo de 45 min;

11.- Los geles fueron teñidos durante 12h con solución de azul de coomassie, y fueron desteñidos con mezcla de metanol, etanol y ácido acético; 12.- Los geles fueron interpretados de acuerdo a su peso molecular (PM)

Estudio de la digestibilidad gastrointestinal in vitro de las proteínas del albumen de huevo.

Digestión gástrica in vitro

Para el proceso de la digestión gástrica *in vitro* se siguió la metodología descrita por Quinteros *et al.* (2016) con modificaciones. Las proteínas fueron sometidas a un proceso de hidrolisis gástrica simulando las condiciones fisiológicas humanas del estómago. Para ello se usó la enzima pepsina a dos concentraciones diferentes. Las digestiones se llevarán a cabo en fluido gástrico simulado de pH: 1.2; 2.0; 3.2, simulando condiciones estomacales de adultos con trastornos gástricos, adultos sanos y niños no lactantes. Se pesó 10mg de proteína aislada a pH 5.8 en un tubo eppendorf de 1.5ml y se añadió 1 ml de agua mili Q o tipo 1 para ser diluida con fluido gástrico simulado (SFG, NaCl 0.35 M) ajustados a diferentes pHs: 1.2; 2.0; 3.2 a 37°C durante 120 minutos con pepsina porcina. Para detener la hidrolisis, en cada muestra se debe colocar 200µL de NaHCO₃ (bicarbonato de sodio) 1M, deteniendo de esta manera la reacción enzimática a 10 min por 80°C. Para comparar resultados se debe usar la técnica de electroforesis SDS-PAGE para asegurar la repetitividad de los resultados.

Digestión duodenal in vitro

Para este proceso de digestión duodenal se siguió el método descrito por (Martos *et al.*, 2010), preparamos los simuladores de fluido duodenal (SFD). Fosfato de potasio monobásico KHPO₄ + NaOH ajustados a pH 6.8 a 7.0 neutro, en la cual se tomó KHPO₄ diluyéndolo en 200ml de agua a una concentración final de 100 µL; Proceso en la cual se tomó en cuenta una relación de 1:1 el digerido gástrico fue de 1ml + 1ml de SFD a pH 7 manteniéndolo en temperatura de 37°C durante 120 minutos, finalmente se elevó a una temperatura de 80°C por 10 minutos la cual permite parar la reacción enzimática. Para determinar resultados se obtuvo por electroforesis SDS-PAGE. Sometiendo esto a influencias de un campo eléctrico con un voltaje de 200 voltios con 50 mA por 1 hora.

Resultados y discusión

Cuadro 1. Extracción proteica %

Extracción Proteica		36.74**		
Tratamiento	Medias	Tukey 5%	Mínima	Máxima
H 12	28.90	A	27.7	30.0
H 24	24.11	B	20.7	26.0
H 48	20.04	C	17.9	22.7
H 72	19.98	C	18.4	21.9
Gran Media	23.26			

H = horas luego de la recolección de los huevos

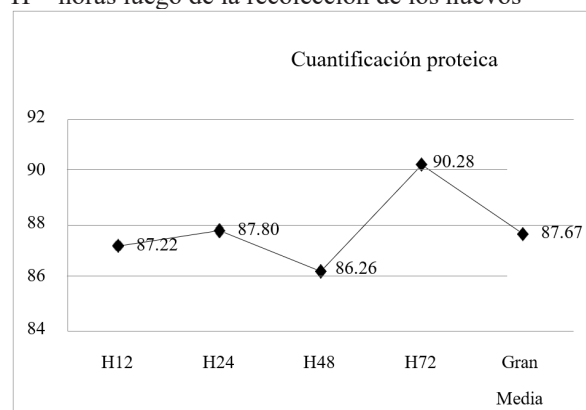


Figura 1. Cuantificación proteica (%).

Según la distribución de Fisher la cuantificación proteica de albumen de huevo de codorniz, el porcentaje de proteína máximo es de 90.28% a las 72 horas de recolección del huevo posterior a la postura y una media mínima de 87.22% a las 12 horas. Lo que permite deducir que a las 72 horas el comportamiento es heterogéneo con un CV 1.33 siendo significativo estadísticamente con un 95% de confianza.

Mientras que en la figura 1, podemos observar donde H 72 contiene un porcentaje proteico elevado con relación a los otros tratamientos, por lo tanto, el tiempo que transcurre desde la recolección hasta su destino final incide en una elevación del aje proteico tal como lo menciona Rodríguez (2017) en su investigación; manifestando que las proteínas tienen capacidad desnaturizante y renaturalizante si esta no es sometida a cambios extremos de temperatura, agentes físicos u otros.

En la cuantificación proteica por analizador elemental de albumen liofilizado de huevo de codorniz obtenido por su punto isoeléctrico nos mostró un contenido de proteico (87.22-90.28%) comparación con el valor reportado para huevos de gallina con la misma técnica realizada por Verdezoto (2019), con

79.90-84.01%; determinando que el huevo de codorniz contiene mayor valor biológico con relación al huevo de gallina.

Caracterización del perfil proteico mediante la técnica de electroforesis

Los aislados proteicos analizados mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), aislado por su punto isoeléctrico a pH 5.8. Técnica de electroforesis SDS-PAGE con β -mercaptoetanol la cual ayuda a romper los enlaces disulfuro. Pocillo 1: estándar; pocillo 2, 3, 4, 5 proteína aislada de huevo de codorniz con buffer + β ; pocillos 6, 7, 8, 9 proteína aislada de huevo de codorniz en sus respectivos tiempos con buffer - β .

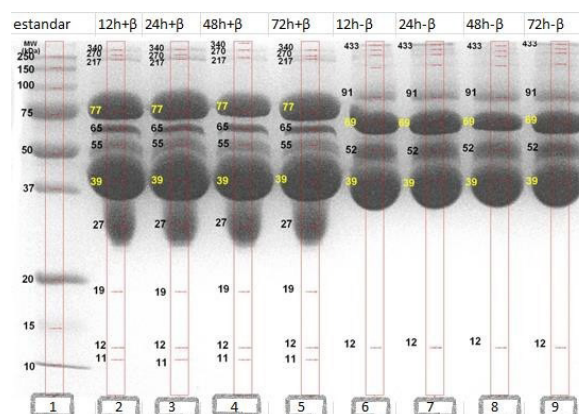


Figura 2. Gel de poliacrilamida con pesos moleculares de huevo de codorniz

Se muestra en el patrón electroforético de las muestras liofilizadas de clara de huevo de codorniz, en donde se encontraron 8 bandas siendo las de mayor contenido las de 77, 39 y 27 kDa también encontramos bandas de menor contenido que pertenecen a pesos moleculares de 270, 65, 55, 19 y 12 kDa dando los mismos patrones en huevos de 12, 24, 48 y 72 horas en presencia del agente desnaturizante β -mercaptoetanol. En el patrón electroforético de muestras liofilizadas en ausencia de β -mercaptoetanol, Muestra 3 banda siendo de mayor cantidad las de 69.52, 39kDa y en menor cantidad las proteínas de 433.91 y 12kDa. Conteniendo el mismo patrón en huevos de 12, 24, 48 y 72 horas.

Evaluación de la digestibilidad gástrica y duodenal in vitro mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE

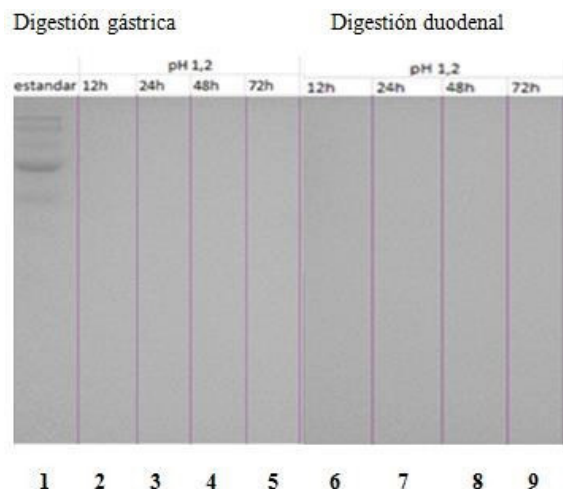


Figura 3. Digeridos a pH1.2

Los hidrolizados se analizaron por la técnica de electroforesis SDS-PAGE dando como resultado que las proteínas de los pocillos 2, 3, 4 y 5 que simulan un pH (1.2) de adultos con problemas gástricos comparados con el estándar las bandas son inexistentes, lo que evidencia una digestión total evidenciados también en la digestión Duodenal que observamos en los pocillos 6, 7, 8 y 9.

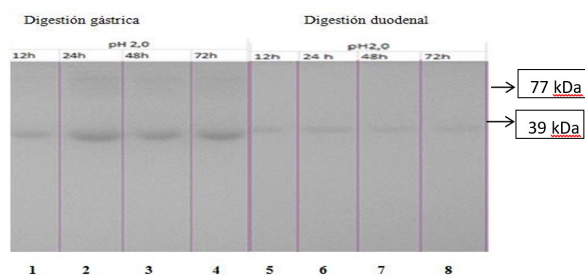


Figura 4. Digestión in vitro pH 2.0

En el siguiente gel donde se realizó la digestión en pH (2.0) que simula el estómago de un adulto sano, podemos evidenciar que en los pocillos 1, 2, 3 y 4 de digestión gástrica encontramos bandas con PM de 39kda correspondiente a ovoalbúmina las cuales al pasar al siguiente proceso de digestión como es la duodenal aún quedan residuos.

También se evidencia las bandas de 77 kDa en baja densidad en los pocillos 2, 3, 4 correspondientes a ovotransferrina, pero al completarse la digestión esta proteína desaparece en su totalidad demostrando que esta proteína es digerible para las personas adultos sanos.

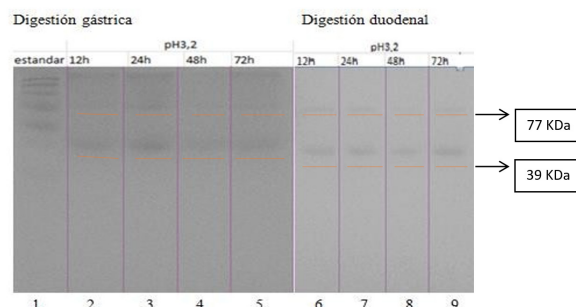


Figura 5. Digestión in vitro pH 3.2

En el siguiente gel anterior se observa la digestión in vitro a pH 3.2 que simula el estómago de un niño no lactante, se evidencia dos proteínas cuyas bandas pertenecen a 77 kDa ovotransferrina, y 39kDa ovoalbúmina su presencia es en todos los pocillos determinando que no existe una digestión correcta de las proteínas de huevo de codorniz en niños pequeños.

Conclusiones

El contenido proteico del albumen de huevo de codorniz es de 87.22-90.28% el cual es superior a porcentaje proteico de huevo de gallina (82.11%) reportado en investigaciones similares.

Los Factores de conservación del huevo en su recolección, transporte y manejo hasta su consumo final influyen directamente en la conservación y renaturalización de la proteína digestible.

Las proteínas ovotransferrina y ovoalbúmina son las que se encuentran en mayor cantidad en el albumen de huevo de codorniz mostradas en la caracterización proteica mediante electroforesis SDFS-PAGE.

En la simulación para la digestión gástrica y duodenal se determinó que las proteínas del huevo de codorniz son de fácil digestión en adultos que presentan problemas gastrointestinales pH 1.2 mientras que en la simulación in vitro de menores no lactantes a pH 3.2 estas proteínas son parcialmente digeribles lo cual puede representar un problema; de tal modo que se podría sugerir el consumo de huevo de codorniz en edades de pos lactancia y en adultos de todas las edades e inclusive con problemas celíacos sin riesgo de manifestaciones patológicas.

Literatura citada

- Carrillo, W, Tubòn , J., & Vilcacundo , J. (2016). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 345.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the heat bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

- López Fandiño, R. (2014). *Compuestos Bioactivos del Huevo de uso Potencial en Alimentos Funcionales*. Recuperado el 30 de Abril de 2018, de Avicultura: <http://www.avicultura.com/2014/03/27/12218/>
- Martos, G., Contreras, P., Molina, E., & López, R. (2010). Egg White Ovoalbumin digestion mimicking physiological conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 5640-5648.
- Quinteros, F. (2016). *Estudio de la Digestibilidad Gastrointestinal, citotoxicidad y actividad antiinflamatoria de proteínas extraídas de la torta de sachá inchi (Plukenetia volubilis L.)*. Obtenido de Universidad Técnica de Ambato : <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/23823/1/AL608.pdf>
- Quinteros, M., Vilcacundo, R., Carpio, C., & Carrillo, W. (2016). Digestibility and Anti-inflammatory Activity in vitro of Sachá Inchi (Plukenetia Volubilis L) Proteins. *Asian Journal of Pharmaceutical And Clinical Research*, 9, 302, 303.
- Rodríguez, V. (27 de Noviembre de 2017). *Prezi*. Recuperado el 23 de Julio de 2019, de Renaturalización y desnaturalización de las proteínas :<https://prezi.com/gnp5763y2ej3/renaturalizacion-y-desnaturalizacion-de-las-proteinas/>
- Verdezoto, S. (2019). Caracterización molecular de aislados proteicos de albumen de huevo de gallina, procedentes de producción ecológica vs producción comercial. 53.