

Los Alimentos: una Aproximación Proteómica en su Estudio

Jocelin Rizo, Catalina Cárdenas y Romina Rodríguez-Sanoja*

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 04510.

E-mail: romina@biomedicas.unam.

RESUMEN

La proteómica es el estudio a gran escala de las proteínas. Permite tener una imagen dinámica de las proteínas que se están expresando en un momento dado y bajo determinadas condiciones de tiempo y ambiente. Sus principales aplicaciones se han dado dentro del ámbito de la biología y medicina. Sin embargo, el desarrollo de nuevas tecnologías y su aplicación al estudio de matrices complejas ha permitido su incorporación al estudio de alimentos, para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos, evaluación de la seguridad de los alimentos, identificación de biomarcadores de calidad y autenticidad, entre otros. En este trabajo, se presenta una breve reseña de las principales aplicaciones que se le han dado a la proteómica en el área de los alimentos.

Palabras clave: *proteómica, alimentos, alérgenos en alimentos, autenticidad de alimentos, detección de patógenos.*

ABSTRACT

Proteomics allows to have a dynamic picture of the proteins that are being expressed at a given time and under certain environmental conditions. Its main applications are given within the field of biology and medicine. Development of new technologies and their application to the study of complex matrices has allowed its incorporation to the study of food for finding new bioactive compounds, evaluation of food safety and identification of quality and authenticity biomarkers, among others. In this paper, we present a brief overview of the main applications that have been given to proteomics in the area of food.

Key words: proteomics, food allergens, food authenticity, detection of pathogens

INTRODUCCIÓN

Las proteínas son fundamentales en todos los aspectos de la estructura y la función celular. Existen muchas clases diferentes de proteínas, cada una de ellas especializadas en una función biológica diferente:

reacciones catalíticas, transporte de moléculas, traducción de señales, entre otras (Lehninger). Adicionalmente, son las biomoléculas más diversas, en cuanto a propiedades bioquímicas, composición y estructura.

Artículos

El término proteoma fue introducido en 1994 por Wilkins y fue definido como el estudio del conjunto completo de proteínas codificadas por un genoma en una célula, un tejido u organismo; en un punto particular en el tiempo (Martins *et al.*, 2007). A diferencia del genoma, el proteoma es altamente dinámico y sus componentes varían en un organismo, tejido, célula o compartimiento subcelular como consecuencia de los cambios en su entorno: situaciones de estrés, administración de drogas, señales bioquímicas, estado fisiológico o patológico, estado metabólico y muchas otras interacciones (Pischetsrieder & Baeuerlein, 2009; Kvasnicka, 2003; Carbonaro, 2004). Los estudios proteómicos, en conjunto con otras metodologías permiten no sólo la identificación y cuantificación de proteínas, sino también hacen posible conocer su localización, modificaciones, interacciones, actividades y función.

El crecimiento exponencial de estos estudios se debe principalmente a la revelación de más y nuevas proteínas; al desarrollo de nuevas tecnologías que se basan principalmente en la combinación de técnicas ya conocidas y a la posibilidad de interpretar y analizar grandes cantidades de datos gracias a los diferentes software que se han desarrollado (<http://www2.cbm.uam.es/jvazquez/PDFs/Proteomica.pdf>).

Inicialmente estos estudios se basaban en la separación de las proteínas por

electroforesis en dos dimensiones (Fields), sin embargo, existen algunas limitaciones para resolver proteínas que son o muy ácidas o básicas y de bajo peso molecular (Issaq & Veenstra, 2008).

Para contrarrestar estas limitaciones y tomando en cuenta que no existe hasta el momento una sola técnica capaz de identificar y cuantificar todos los componentes de una mezcla compleja de proteínas, es común la combinación de la electroforesis en dos dimensiones junto con la espectrometría de masas. Para ello, las proteínas son separadas de acuerdo a su peso molecular y punto isoeléctrico, lo que permite obtener una distribución uniforme en la matriz bidimensional. El gel resultante puede ser considerado como la “huella digital” de la muestra y los spots de interés son escindidos para su digestión y análisis por espectrometría de masas. Sin embargo, la identificación de cada uno de los spots es laboriosa y se limita a las proteínas de mayor abundancia.

Una estrategia alternativa, es la purificación de las proteínas por métodos cromatográficos lo que permite el enriquecimiento de la muestra y el análisis de mezclas complejas de péptidos, tales como los producidos por la digestión directa de un proteoma sin necesidad de separar sus componentes mediante electroforesis (“shotgun”) (Aebersold & Mann, 2003).

Existen diferentes ramas de la proteómica que tratan de caracterizar el proteoma estudiando distintos aspectos del mismo:

- Proteómica descriptiva o estructural para todas las proteínas expresadas en un momento y en un contexto.
- Proteómica comparativa para identificar diferencias a nivel de expresión de proteínas que se asocian a cambios en las condiciones de un organismo.
- Proteómica funcional para la identificación de conjuntos funcionales de proteínas. Es decir, grupos de proteínas que se localizan en un mismo sitio y que operan en mutua interacción (interacciones proteína-proteína).
- Identificación de las proteínas que forman un organelo, lo que ha permitido la elaboración de mapas moleculares de la célula (Castellanos *et al.*, 2004).

Las principales aplicaciones se han desarrollado en el ámbito de la proteómica médica, pero existen aún numerosas limitaciones cuando se trata de estudiar muestras diferentes, como las ambientales, donde muchos microorganismos no han podido ser cultivados en condiciones de laboratorio y por lo tanto no se tiene prácticamente ninguna información sobre ellos. El estudio de los proteomas derivados de todo un conjunto de organismos de un mismo ecosistema, se denomina metaproteómica, y aunque es un área de reciente desarrollo, ya ha permitido obtener una visión general de diferentes sistemas tales como suelo, ambientes marinos, y del metaproteoma humano del tracto gastrointestinal (Wilmes & Bond, 2006).

LA PROTEOMICA EN EL ESTUDIO DE ALIMENTOS

Los alimentos son matrices complejas que tradicionalmente han sido estudiadas desde una perspectiva química, fisicoquímica, microbiológica y sensorial. Sin embargo, la aplicación de herramientas proteómicas en su estudio podría contribuir en la:

- Búsqueda de nuevos compuestos bioactivos funcionales
- Evaluación de la seguridad de los ingredientes alimentarios
- Detección y control del deterioro de alimentos o microorganismos patógenos
- Identificación de biomarcadores
- Identificación de proteínas causantes de alergias
- Calidad y autenticidad de alimentos
- Producción de ingredientes alimentarios
- Procesamiento de alimentos (Kvasnicka)

Al igual que la mayoría de las herramientas novedosas, su inserción en el estudio de alimentos ha sido lenta. La figura 1 muestra los resultados obtenidos a partir de una búsqueda en PubMed con los términos “proteómica” y “alimentos”. Se observa un incremento a partir del año 2011. Sin embargo, en comparación con otras áreas como la biomedicina, (identificación de biomarcadores de diferentes enfermedades o en diferentes tipos de cáncer) su aplicación sigue siendo baja.

El primer paso en todo estudio proteómico.
Para poder llevar a cabo el estudio de

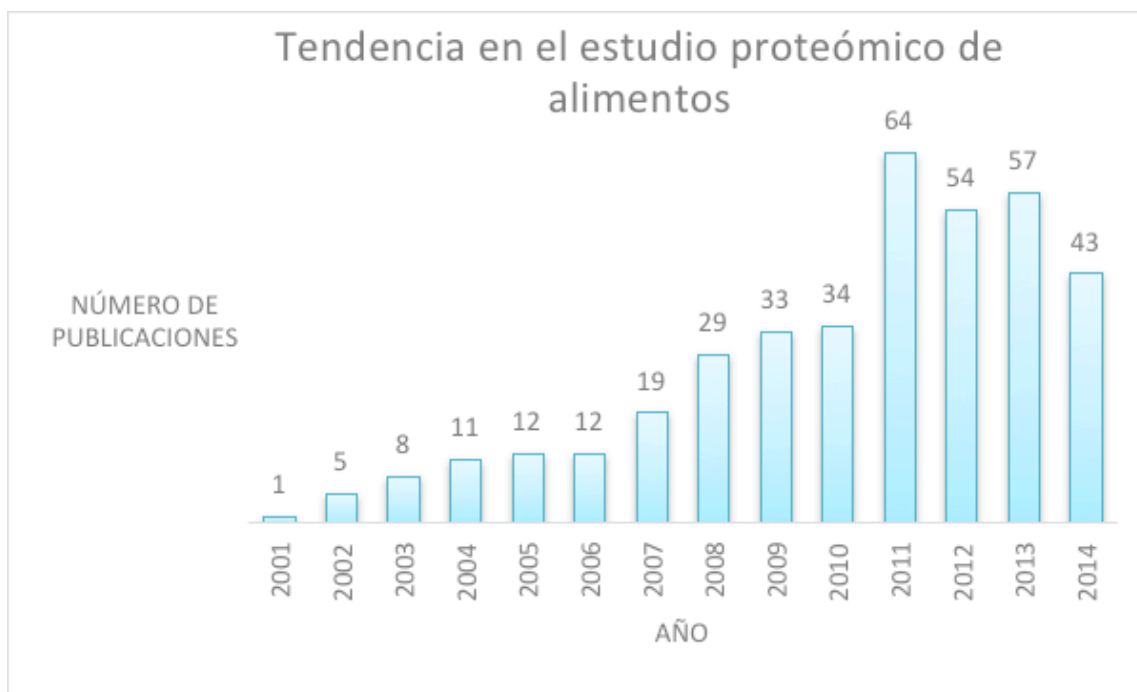


Fig. 1. Tendencia del estudio proteómico en alimentos. <http://gopubmed.org/web/gopubmed/>

las proteínas es necesario disponer de técnicas que permitan separarlas, identificarlas y cuantificarlas. Las técnicas de separación pueden ser divididas en dos campos: 1) técnicas electroforéticas y 2) técnicas cromatográficas.

Dentro de las primeras, la electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones (2-DE) es el método estándar utilizado para la separación de las proteínas. Este tipo de geles, permite obtener un arreglo o despliegue físico de las proteínas, separándolas por punto isoeléctrico y peso molecular (Bodzon-Kulakowska *et al.*, 2006).

A pesar de que presenta algunas limitaciones con respecto a la reproducibilidad, resolución, y dificultad para la separación eficiente de las proteínas de baja abundancia, esta técnica sigue siendo

uno de los métodos más utilizados para estudiar muestras complejas.

Diferentes protocolos se han desarrollado para contrarrestar estas limitaciones. Sin embargo, la extracción de las proteínas sigue siendo un paso restrictivo en el estudio proteómico, puesto que es necesario lograr la solubilización de todas las proteínas presentes en el sistema (Martins *et al.*, 2007).

Para la selección del método de extracción, es necesario tomar en cuenta las características físicas y químicas de la muestra, para su posterior adaptación y optimización, dependiendo del tipo de muestras y proteínas de interés. La precipitación de proteínas es generalmente considerada como un paso esencial para su concentración y purificación, ya que permiten

eliminar componentes (azúcares solubles, lípidos, ácidos orgánicos entre otros) que interfieren con el análisis proteómico.

Amoako-Andoh *et al.* (2014), evaluaron tres protocolos de extracción ampliamente usados en proteómica (extracción con Tritón X-100, extracción con SDS y extracción con fenol), en combinación con diferentes métodos de precipitación en una muestra de plátano. El grado de recuperación de proteínas depende del método de precipitación y re-solubilización. Los mayores rendimientos se obtuvieron con fenol como agente precipitante en combinación con buffer R2D2 (5 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, 2% C7BzO (3-(4-heptil) fenil-3-hidroxiopropil dimetil propanosulfonato de amonio), 20 mM DTT, 5 mM TCEP-HCl y 0.25% anfolitos), para la solubilización de las proteínas.

La complejidad del estudio se incrementa, cuando el alimento no proviene de un solo organismo, sino de mezclas complejas de estos como en los alimentos fermentados. El pozol por ejemplo, un alimento fermentado elaborado a partir de masa de maíz nixtamalizado, contiene cantidades importantes de almidón (75%) y proteínas de reserva del maíz (50% del total de proteínas) que interfieren en la detección de las proteínas de los microorganismos que fermentan la masa. A pesar de la complejidad del sistema se desarrolló y optimizó un protocolo para la recuperación de las proteínas y su posterior análisis.

Se observó que a los 15 días de fermentación, las proteínas mayormente representadas pertenecen al grupo de las

bacterias ácido lácticas, principalmente del género *Lactobacillus*, mientras que los hongos están representados por *Aspergillus*. En ambos casos, las proteínas predominantes son las relacionadas al metabolismo de carbohidratos y producción de energía (Cárdenas *et al.*, 2014).

En el vino, la concentración de proteínas es baja pero estas tienen un papel crucial en sus características. La mayor limitante que existía para el estudio de la proteómica del vino era la falta de métodos adecuados para la extracción y posterior separación de las proteínas por 2-DE. Mainente *et al.* (2014), optimizó la extracción de proteínas en una muestra de vino tinto (cv. Carbernet) para su posterior separación y análisis por masas. La concentración de proteína extraída fue de 115 ± 25.1 mg de proteína/L y se lograron identificar tanto proteínas del vino como de *Botrytis cinerea* lo que podría indicar posible infección de las uvas.

DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Una aplicación directa de la proteómica de alimentos es la detección de microorganismos patógenos. Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminadas con estos microorganismos. Constituyen un importante problema de salud pública debido a su alta incidencia, a la resistencia que presentan y a la existencia de muchos grupos vulnerables. Su presencia, es un indicador directo de la calidad higiénico-

Artículos

sanitaria de los alimentos debido a la contaminación de la materia prima, o a alguna deficiencia higiénica durante el procesamiento.

El control de los microorganismos causantes de ETA, depende en cierta medida del método analítico que se utiliza para su detección. De manera usual, su identificación se hace con base en criterios morfológicos y fisiológicos mediante el cultivo de muestras de alimentos posiblemente contaminados, en diversos medios de cultivo y bajo condiciones establecidas. Sin embargo, la obtención de resultados puede tomar días o semanas y las bacterias pueden entrar en un estado viable pero no cultivable (González & Herrera 2005).

Esto ha generado la necesidad de desarrollar procedimientos más sensibles que permitan la tipificación e identificación de microorganismos patógenos. La amplificación

de secuencias blanco de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), ha permitido el procesamiento de grandes cantidades de muestras en tiempos cortos y con ello, la identificación de microorganismos no cultivables. No obstante, debido a que los alimentos son matrices complejas, la eficiencia del método puede reducirse significativamente por la presencia de polisacáridos, proteínas, sustancias inhibitorias y lípidos dando lugar a resultados falsos o poco confiables.

La detección de proteínas implicadas en la resistencia y adaptación de los microorganismos a ciertas condiciones de estrés, así como en los mecanismos de patogenicidad y producción de toxinas, entre otras, es una alternativa que podría permitir solventar estas limitantes (Tabla 1).

Tabla 1. Estudios proteómicos realizados en microorganismos patógenos de los alimentos

| Muestra | Propósito del estudio | Método utilizado | Referencia |
|-------------------------------|---|------------------|----------------------|
| <i>Fusarium graminearum</i> | Estudio de las proteínas secretadas implicadas en la patogenicidad en cebada y trigo | 2-DE y MS/MS | Yang et al., 2012 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Comparación de la respuestas de diferentes cepas de <i>L. monocytogenes</i> a condiciones alcalinas | Shotgun | Nilsson et al., 2012 |
| <i>Penicillium expansum</i> | Papel crucial de proteínas antioxidantes y enzimas hidrolíticas en la patogenicidad | 2-DE y MS/MS | Qin et al., 2007 |

EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS ALERGÉNICAS

La alergia a los alimentos es una respuesta de hipersensibilidad del sistema inmune que afecta hasta un 4% de niños y adultos en países desarrollados. La mayoría de estas reacciones alérgicas en alimentos se debe a las proteínas y van desde reacciones leves, que pueden ser de naturaleza transitoria (ceden con el tiempo), hasta graves, que pueden provocar la muerte (Sancho & Mills, 2010).

Los alimentos que causan las reacciones más graves y que se ven implicados con mayor frecuencia son los cereales (debido al alto contenido de gluten), huevos, pescados, leche, soya, nueces y otros frutos secos. Al menos 70 alimentos se han correlacionado como causantes de alergias alimentarias (http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_03_allergy_June06_sp.pdf).

Los métodos para la detección de alérgenos en alimentos, son principalmente la detección de proteínas por medio de anticuerpos (ELISA). Sin embargo, la cuantificación por métodos inmunológicos se ve afectada por la presencia de distintos alérgenos provenientes de otros alimentos, la complejidad de la muestra y la variabilidad de la especificidad de los anticuerpos. Un método alternativo para su detección y cuantificación ha sido la proteómica (Monaci & Visconti, 2009).

La extracción en fase sólida, acoplada a la cromatografía líquida para la posterior identificación de las proteínas por

espectrometría de masas, ha permitido la detección de trazas de tres proteínas alergénicas de leche de vaca (lactoalbúmina, lactoglobulinas A y B), en muestras de 9 mezclas de jugo de frutas y 5 jugos de naranja adquiridos en un mercado local de Bélgica. De ellos, ninguno declaraba la presencia de leche en su etiqueta (Monaci & van Hengel, 2008).

La complejidad de las muestras normalmente afecta la sensibilidad y la selección de los métodos espectrométricos, por lo que es deseable el enriquecimiento de las muestras cuando se quiere analizar péptidos para su utilización como marcadores. Careri *et al.* (2008) desarrollaron un procedimiento de extracción inmunomagnética, seguido por digestión con tripsina, lo que permitió la identificación, detección y cuantificación de trazas del alérgeno Ara h3/4 en el cacahuate y en diferentes cereales comerciales.

Previo al desarrollo de métodos basados en espectrometría de masas para la detección de alérgenos, es necesario establecer las secuencias de las proteínas que servirán como etiquetas para su identificación. Además, se debe considerar que los alimentos sufren diversas modificaciones durante su procesamiento. Por ejemplo, los cacahuates generalmente son tostados bajo una gran variedad de condiciones, afectando la estabilidad y estructura de las proteínas. Al analizar tres muestras de cacahuate sin tostar, con tostado medio (12 min a 140°C) y tostado

fuerte (20 min a 140°C), por cromatografía en capa líquida, combinada con espectrometría de masas en tándem (Q-TOF), se establecieron los posibles péptidos para las proteínas Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3. Dichos péptidos, pueden servir como marcadores específicos para su detección sin importar el procesamiento (Chassaing *et al.*, 2007).

CALIDAD Y AUTENTICIDAD DE ALIMENTOS

Los consumidores exigen información clara y fiable sobre los alimentos que consumen, esta información es de utilidad al momento de elegir el producto que se va a comprar. Por ejemplo, un producto puede ser elegido basándose en la salud del consumidor, en su religión, sus preferencias y sus alergias entre otros. Por ello, es de suma importancia que el etiquetado de los productos sea el correcto y con una descripción fiel de su contenido (Sentandreu *et al.*, 2009).

Un objetivo importante en la industria de los alimentos, es la autenticación de los mismos, por lo que se busca que los métodos para su análisis sean robustos, precisos y sensibles. El análisis proteómico puede ser aplicado en la autenticación de alimentos, mediante la detección de marcadores, los cuales deben ser característicos de los sustituyentes.

Existen ejemplos de adulteraciones en alimentos, como es el reemplazo de manteca de cacao por otras grasas en chocolatería, la sustitución de café de alta calidad por uno de menor calidad, en los productos cárnicos, la

sustitución de carne de alta calidad por carne de menor valor, lo que resulta en un mayor beneficio para los productores.

Los métodos proteómicos han permitido la detección de carne de pollo en mezclas con carne de puerco mediante un procedimiento sencillo (Fig. 1).

Usando esta aproximación, se detectaron 0.5% de proteínas contaminantes (provenientes de carne de pollo), utilizando como proteína blanco la cadena ligera de la miosina 3. Además de su simplicidad, este enfoque tiene la ventaja de que puede ser aplicado de forma eficaz, tanto en carne cruda, como para la cocida (Sentandreu *et al.*, 2009).

La calidad de la carne está determinada por sus propiedades físico-químicas (pH, capacidad de retención de agua, color, textura, entre otros), organolépticas (suavidad, consistencia, olor, sabor), y las microbiológicas. A su vez, estas se ven influenciadas por otros factores como los sistemas de producción, alimentación y manejo pre-mortem de los animales y post-mortem de la carne (Hernández *et al.*, 2007). Después del período post-mortem, la carne sufre algunos cambios importantes debido a la falta de oxígeno y a la acumulación de lactato. Hay rigidez, debido a la formación irreversible del complejo actina-miosina y descenso de pH. A pesar de que estos mecanismos están bien establecidos, continua la pregunta de cómo la degradación de algunas proteínas durante el almacenamiento de la carne afecta la ternura.



Fig. 2. Aproximación proteómica desarrollada para la detección de la autenticidad de un producto cárnico.

El estudio de los perfiles proteicos en músculo de cerdo, durante las primeras 48 horas de almacenamiento post-mortem, permitió el reconocimiento de aproximadamente 1000 proteínas individuales. El patrón general de proteínas a los tiempos 0, 4, 8, 24 y 48 horas parece ser notablemente consistente durante el envejecimiento *post mortem*, esto sugiere que las propiedades de solubilidad de la mayoría de las proteínas del músculo no se ve alterada durante el almacenamiento.

Sin embargo, la comparación de estos perfiles mostró cambios muy notables en al menos 15 proteínas, debido principalmente a su hidrólisis durante el almacenamiento. Su análisis posterior, permitió confirmar la degradación de algunas proteínas estructurales como la titina, nebulina, desmina, filamina y viculina y por primera vez, se demostró que la actina también es degradada (Lametsch & Bendixen, 2001; Lametsch *et al*, 2002).

Algunos estudios proteómicos realizados en alimentos se enlistan en la Tabla 2.

BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Nutricionalmente, la calidad de las proteínas no solo depende de la composición de aminoácidos, de su digestión, absorción y subsecuente anabolismo, sino también de los péptidos que se liberan. Muchas funciones en el organismo son mediadas por péptidos, ya que actúan como neurotransmisores, hormonas o antibióticos.

Debido a que los péptidos presentes en los alimentos pueden tener estructuras similares a los péptidos endógenos del organismo hospedero, es razonable pensar que son capaces de interactuar con sus receptores y desempeñar un papel en la regulación de la respuesta inmune como factores de crecimiento o actuar como antimicrobianos. Estos pueden derivar de proteínas de leche, pescado, huevo, carne, cereales, leguminosas, entre otros (Saavedra *et al*, 2013; Sánchez-Rivera *et al.*, 2014).

Los péptidos pueden ser generados durante la manufactura del alimento a través de diferentes procesos como la fermentación o maduración, pero la mayoría surgen debido a la hidrólisis de las proteínas de la dieta durante su digestión (Barbé *et al*, 2014).

El creciente interés en el estudio de los péptidos, ha dado como resultado la creación de un subcampo dentro de la proteómica de alimentos, la peptidómica (Saavedra *et al*, 2013; Sánchez-Rivera *et al*, 2014). Barbé *et al.* (2014) estudiaron la liberación de péptidos en el tracto gastrointestinal de cerdos

alimentados con seis matrices de lácteos. De este modo, lograron la secuenciación e identificación de más de 16 000 péptidos, de los cuales 86% y 14% resultaron de la hidrólisis de caseína y β -lactoglobulina, respectivamente. Del total de péptidos liberados de caseína, α s1-, α s2-, β - y κ -caseína representaron el 28%, 15%, 48% y 8%. Entre todos estos, 29 son conocidos por tener actividades biológicas como emulsificantes, antihipertensivos, antioxidantes, antimicrobianos, e inhibidores de proteasas, entre otras.

LOS ALIMENTOS FERMENTADOS

La fermentación de los alimentos es una práctica muy antigua presente en todas las culturas del mundo, ya que es uno de los métodos de preservación de alimentos más antiguo y económico que se conoce. Su procesamiento involucra el crecimiento y actividad de microorganismos (bacterias y hongos).

Uno de los alimentos fermentados más antiguos es el vino de miel, la primera bebida alcohólica de la que se tiene conocimiento, la cual es elaborada a partir de la fermentación de los azúcares de miel de abeja. La fermentación es una forma natural de aumentar el valor nutricional a través de la síntesis de aminoácidos esenciales y vitaminas. Permite mejorar las características organolépticas, aumentar la digestibilidad del sustrato, eliminar sabores y texturas desagradables (Kabak *et al*, 2011).

Artículos

Tabla 2. Ejemplos de aplicaciones de la proteómica en alimentos (Carbonaro, 2004).

| Método utilizado | Propósito del estudio |
|--|--|
| Proteómica en carne | |
| 2-DE junto con espectrometría de masas | Identificación y caracterización de proteínas y enzimas como marcadores, así como los niveles específicos de estas que se expresan en ciertos animales |
| 2-DE | Mapa proteómico de ratón que se ha empleado como referencia para la comparación de diferentes tipos de carne |
| 2-DE junto con espectrometría de masas | Estudio de los cambios en la calidad de la carne asociados con el envejecimiento post-mortem y las interacciones inducidas en las proteínas del músculo con lípidos, carbohidratos y otros componentes de la carne |
| 2-DE | Identificación de cambios moleculares que ocurren en el tejido muscular y en la carne de puerco durante el almacenamiento de la carne |
| Proteómica en cereales | |
| 2-DE junto con espectrometría de masas | Estudio de los múltiples mecanismos de regulación en respuesta a selenio en arroz |
| 2-DE junto con espectrometría de masas | Estudio de la germinación de las semillas de arroz centrándose en los en el perfil de cambios de la expresión de proteínas |
| 2-DE junto con espectrometría de masas | Mapa proteómico del endospermo del maíz |
| Proteómica en bebidas fermentadas | |
| 2-DE junto con espectrometría de masas | Estudio de los cambios bioquímicos inducidos durante la fermentación del mosto por la cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Z622 |
| 1-D junto con espectrometría de | Detección de aditivos en vinos blancos |

Artículos

| | |
|--|---|
| masas | |
| 2-DE junto con espectrometría de masas | Detección de proteínas que se expresan diferencialmente en uvas vinícolas en respuesta a la infección por <i>Xylella fastidiosa</i> |
| Shotgun | Análisis de proteínas de bajo peso molecular en vinos y su posible potencial inmunogénico |
| Espectrometría de masas y ELISA | Detección de péptidos antigénicos en dos cervezas italianas |

Los principales tipos de fermentación son: la alcohólica, ácido láctico, ácido acético y alcalina. En la primera, las levaduras son los microorganismos predominantes y el producto final de la fermentación es el etanol. La fermentación ácido láctico (leches fermentadas, cereales) es llevada a cabo por bacterias ácido lácticas, cuya fermentación puede ser heterofermentativa u homofermentativa, los productos finales de la fermentación son, en el caso de la heterofermentativas, una mezcla de ácido láctico, CO₂ y acetato o etanol; y en el caso de la homofermentativas, lactato. Un segundo grupo de bacterias importantes en la fermentación de alimentos son las bacterias productoras de ácido acético a partir de alcohol. Por otro lado las especies de *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus pumilius*) hidrolizan proteínas a aminoácidos y péptidos con liberación de amonio, lo que aumenta la alcalinidad del alimento en el que se encuentran (fermentación alcalina) (Battcock & Azam-Ali, 1998; Blandinob *et al*, 2003). Estos organismos son los responsables de

las propiedades finales como la textura y sabor.

Dentro de las bebidas fermentadas, la cerveza es una de las más antiguas y consumidas en todo el mundo. Su elaboración puede ser dividida a grandes rasgos en dos procesos principales: el primero consiste en la conversión del almidón de la cebada en azúcares fermentables por acción enzimática durante el malteo y la posterior fermentación alcohólica por la acción de las levaduras. Durante el malteo hay cambios en contenido de agua, varias enzimas se activan (proteasas, amilasas y β -glucanasas) y algunas proteínas se modifican y degradan, debido a las proteasas del sistema, lo que contribuye a la generación de fuente de nitrógeno para el crecimiento de las levaduras. Las levaduras también excretan algunas proteínas al medio durante la fermentación.

Los estudios proteómicos que se han realizado en la cerveza, han permitido la identificación de proteínas responsables de la calidad de la espuma, como son: BDAI-1, el

inhibidor de tripsina de cebada-CME y la tiorredoxina de levadura (Limure & Sato, 2013).

En los quesos fermentados, las actividades enzimáticas dependen de la lisis celular de los microorganismos iniciadores, principalmente enzimas proteolíticas que confieren las características organolépticas y textura del queso. La identificación de los péptidos liberados en el queso ha permitido determinar la especificidad de las peptidasas de los cultivos iniciadores y se ha observado que estas siguen activas una vez liberadas. Sin embargo, no hay información respecto a la acción secuencial de las enzimas proteolíticas *in situ*.

El análisis electroforético unidimensional del queso Emmental, en las diferentes etapas del proceso de maduración, ha permitido la identificación de proteínas del suero de leche (albúmina sérica bovina, β -lactoglobulina y lactoferrina, entre otras).

Por otra parte, al evaluar por espectrometría de masas el tipo de proteínas que se expresan en las diferentes condiciones de manufactura del queso, se identificaron 62 proteínas, las cuales se agruparon en cinco grupos funcionales: i) proteólisis, ii) glicólisis, iii) respuesta a estrés, iv) reparación de DNA y RNA y v) oxidoreducción.

La expresión de proteínas relacionadas con la respuesta a estrés y reparación de ácidos nucleicos, son un indicativo que los microorganismos que se desarrollan durante la manufactura del queso están sujetos a

diferentes condiciones de estrés como son: calentamiento de la leche (55°C), el ácido producido, la adición de sal y las diferentes temperaturas de incubación que se utilizan durante la maduración (12-24°C). Las proteínas mayormente representadas en esta etapa, son derivadas de *Propionibacterium freudenreichii*, responsable de la mayor producción de ácido propiónico (Gagnaire *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

La proteómica aplicada en ciencia y tecnología de alimentos, proviene de la necesidad de contar con métodos confiables que permitan monitorear los cambios que suceden en los alimentos durante su procesamiento. Actualmente, se espera que un alimento tenga cualidades sensoriales adecuadas, que garantice seguridad y nutrición; además, hay una demanda para el uso de menos aditivos y de productos orgánicos en los mismos.

La proteómica, ha sido utilizada con éxito en la detección de alérgenos, de organismos genéticamente modificados, en el análisis de la integridad de las materias primas o de la contaminación por microorganismos de los alimentos procesados, por lo que su impacto en el análisis de alimentos es creciente. Sin embargo, queda aún mucho por hacer, por lo que los resultados que se obtienen deben ser evaluados cuidadosamente. Se deben considerar tanto las posibles dificultades metodológicas en la extracción de proteína, como la naturaleza de la muestra y el

y el contenido aún limitado de las bases de datos.

La complementación de la proteómica con otras metodologías como la metabolómica y la liberación a las bases de datos de más genomas, deberá dar como resultado información más robusta que tendrá un impacto benéfico en el estado nutricional y en la salud de los consumidores.

AGRADECIMIENTOS

La Q.A Jocelin Rizo agradece a Conacyt por la beca de maestría 480538. Este trabajo es parte de la tesis de maestría en el Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. Con el apoyo de Conacyt 49687-Z y DGAPA-UNAM IN218714.

REFERENCIAS

- Aebersold R & Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422: 198-207.
- Amoako-Andoh F, Daniels B, Keulemans W & Davey M (2014) A systematic evaluation of protocols for a proteomics analysis of (lyophilized) fruit tissues. *Electrophoresis* 35: 1395-1405.
- Barbé F, Le Feunteun S, Rémond D, Ménard O, Jardin J, Henry G, Laroche B & Dupont D (2014) Tracking the in vivo release of bioactive peptides in the gut during digestion: Mass spectrometry peptidomic characterization of effluents collected in the gut of dairy matrix fed mini-pigs. *Food Res. Int.* 63: 147-156.
- Battcock M & Azam-Ali S (1998) Fermented fruits and vegetables. A global perspective. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations .
- Blandinob A, Al-Aseeria ME, Pandiella SS, Canterob D & Webb C (2003) Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res. Int.* 36: 527-543.
- Carbonaro M (2004) Proteomics: present and future in food quality evaluation. *Trends Food. Sci. Tech.* 15: 209-216.
- Cárdenas C, Barkla BJ, Wachter C, Delgado-Olivares L & Rodríguez-Sanoja R (2014) Protein extraction method for the proteomic study of a Mexican traditional fermented starchy food. *J. Proteomics* 111: 139-147.
- Careri M, Elviri L, Lagos JB, Mangia A, Speroni F & Terenghi M (2008) Selective and rapid immunomagnetic bead-based sample treatment for the liquid chromatography–electrospray ion-trap mass spectrometry detection of Ara h3/4 peanut protein in foods. *J. Chromatogr. A* 1206: 89-94.

Artículos

- Castellanos LG, González JL & Padrón G (2004) Proteómica. *In: Combinatoria molecular*. Elfos Scientiae. La Habana. pp. 367-403.
- Chassaing H, Norgaard JV & Hengel AJ (2007) Proteomics-Based approach to detect and identify major allergens in processed peanuts by capillary LC-Q-TOF (MS/MS). *J. Agric. Food Chem.* 55:4461-4473.
- Fields S (2001) Proteomics in Genomeland. *Science* 291(5507): 1221-1224.
- Gagnaire V, Piot M, Camier B, Vissers JP, Jana, G & Leónila J (2004) Survey of bacterial proteins released in cheese: a proteomic approach. *Int. J. Food Microbiol* 94: 185-201.
- González FT (2005) Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México* 47: 388-390.
- Hernández BJ (2007) Efecto del manejo pre-mortem en la calidad de la carne. *Nacameh* 7(2): 41-64.
- limure T & Sato K (2013) Beer proteomics analysis for beer quality control and malting barley breeding. *Food Res. Int.* 54: 1013-1020.
- Issaq H & Veenstra T (2008). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques.* 44(5): 697-700.
- Kabak B & W. Dobson AD (2011) An Introduction to the Traditional Fermented Foods and beverages of Turkey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51: 248-260.
- Kvasnicka F (2003) Proteomics: general strategies and application to nutritionally. *J. Chromatogr. B* 787(1): 77-89.
- Lametsch R & Bendixen E (2001) Proteome Analysis Applied to Meat Science: Characterizing Post-Mortem Changes in Porcine Muscle. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4531-4537.
- Lametsch R, Roepstorff P & Bendixen E (2002) Identification of protein degradation during post-mortem storage of pig meat. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5508-5512.
- Lehninger LA (1983) Bioquímica. Las bases moleculares y estructurales y función celular. Ediciones Omega, S. A.
- Mainente F, Zoccatelli G, Lorenzini M, Cecconi D, Vincenzi S, Rizzi C & Simonato B (2014) Red wine proteins: two dimensional (2-D) electrophoresis and mass spectrometry analysis. *Food Chem.* 164: 413-417.
- Martins-de-Souza D, Menezes O, dos Santos FA, Horiuchu RS, Domingues C, de Paula E, Marangoni S, Gattaz WF, Dias-Neto E & Camillo J (2007) The use of ASB-1 combination with CHAPS is the best for solubilization of human brain proteins for two-dimensional gel electrophoresis. *Brief.*

Artículos

- Funct. Genom. Proteom.* 6: 70-75.
- Monaci L, & van Hengel AJ (2008) Development of a method for the quantification of whey allergen traces in mixed-fruit juices based on liquid chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 1192(1): 113-120.
- Monaci L, & Visconti A (2009) Mass spectrometry-based proteomic methods for analysis of food allergens. *Trends Anal. Chem.* 28:581-591.
- Nilsson RE, Latham R, Mellefont L, Ross T & Bowman JP (2012) MudPIT analysis of alkaline tolerance by *Listeria monocytogenes* strains recovered as persistent food factory contaminants. *Food Microbiol.* 30: 187-196.
- Pischetsrieder M & Baeuerlein R (2009) Proteome research in food science. *J. R. Soc. Chem.* 38: 2600-2608.
- Qin G, Tian S, Chan Z & Li B (2007) Crucial Role of antioxidant proteins and hydrolytic enzymes in pathogenicity of *Penicillium expansum*. *Mol. Cell. Proteom.* 6: 425-438.
- Saavedra L, Hebert EM, Minahk C & Ferranti P (2013) An overview of “omic” analytical methods applied in bioactive peptide studies. *Food Res. Int.* 54: 925- 934.
- Salud OM (2006) Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN). Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_03_allergy_June06_sp.pdf
- Sánchez-Rivera L, Martínez-Maqueda D, Cruz-Huerta E, Miralles B & Recio I (2014) Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. *Food Res. Int.* 63: 170-181.
- Sancho A & Mills EN (2010) Proteomic approaches for qualitative and quantitative characterisation of food allergens. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 58: 42-46.
- Sentandreu M, Fraser PD, Halket J, Patel R & Bramley PM (2009) A proteomic-based approach for detection of chicken in meat mixes. *J. Proteome Res.* 9: 3374-3383.
- Vázquez C J (2014) Presente y Futuro de la Proteómica. Disponible en: <http://www2.cbm.uam.es/jvazquez/PDFs/Proteomica.pdf>
- Wilmes P & Bond PL (2006) Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends Microbiol.* 14(2): 92-97.
- Yang F, Jensen JD, Svensson B, Jorgensen HJ, Collinge DB & Finnie C (2012) Secretomics identifies *Fusarium graminearum* proteins involved in the interaction with barley and wheat. *Mol. Plant Pathol.* 13: 445-453.