

# HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS DE PROTEÍNAS DEL SUERO LÁCTEO: CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LAS SUSTANCIAS PEPTÍDICAS GENERADORAS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

**López Emilse**

*Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC)-UNL-CONICET*

Director: Manzo, Ricardo M.

Co-director: Sihufe, Guillermo A.

**Área: Ciencias Naturales**

## INTRODUCCIÓN

Las proteínas del suero lácteo son una fuente importante de aminoácidos esenciales y una de las fracciones proteicas de más alta calidad disponible para uso comercial. Si bien se han obtenido subproductos a partir del lactosuero, tales como suero entero, suero desmineralizado, concentrados proteicos (WPC), aislados de lactosuero (WPI), caseínas, caseinatos y lactosa (Fenoglio y col., 2016), los mismos presentan escaso valor agregado además de que parte del mismo es descartado, representando una fuente de contaminación ambiental de importancia (González Siso, 1996). De esta manera, el aprovechamiento del suero de quesería es crucial tanto desde el punto de vista científico como tecnológico. La hidrólisis enzimática de las proteínas de suero constituye una línea de investigación de interés, ya que permite la liberación controlada de péptidos bioactivos, cuyas propiedades biológicas no se encuentran accesibles en la proteína madre en pos de elaborar productos nutracéuticos. Por tal motivo, se llevó a cabo una reacción enzimática con la preparación comercial de Alcalase® en condiciones fisicoquímicas controladas sobre una solución de WPC 80 para obtener hidrolizados de dicha suspensión, evaluar la actividad antioxidante (AAO) de todas las muestras y estudiar parcialmente las características de los péptidos responsables de la misma.

## OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo fueron estudiar en hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas la presencia de actividad antioxidante y luego caracterizar fisicoquímicamente y de forma parcial aquellos compuestos causantes de tal funcionalidad empleando estrategias separativas cromatográficas.

## METODOLOGÍA

En primer lugar, se obtuvo la suspensión de hidrolizado por la acción de la enzima Alcalase® 2,4 L FG (EC 3.4.21.62) de *Bacillus licheniformis* (Novozymes, Dinamarca) sobre una solución de WPC 80 preparada al 7% (m/v) en buffer carbonato 100 mM pH 10 y en condiciones controladas (enzima/sustrato (v/v) de 1/110, 50°C, pH inicial 9,25). Éste último se mantuvo constante durante la reacción mediante el agregado de NaOH 0,5 M, determinándose el grado de hidrólisis alcanzado en función del volumen de base agregado (método pH-stato). El hidrolizado y su control fueron acondicionados, liofilizados y preparados a diferentes concentraciones (10, 30 y 100 mg ml<sup>-1</sup>) y pH (6, 7 y libre por disolución en agua) para analizar su capacidad antioxidante, según el método de Re y col.

Título del proyecto: Caracterización de hidrolizados de proteína de suero lácteo y evaluación de su aptitud para ser utilizados en la formulación de un alimento nutricionalmente enriquecido

Instrumento: CientiBeca

Año convocatoria: 2017

Organismo financiador: PICT 2016 (ANPCyT)

Director/a: Dr. Guillermo A. Sihufe

(1999). Seguidamente, el hidrolizado se preparó a una concentración de 40 mg ml<sup>-1</sup> en buffer fosfato 50 mM pH 7 (WPH), siendo luego sometido a un pre-tratamiento el cual consistió en centrifugarlo a 10000 x g a 4°C durante 15 min y luego filtrarlo con membranas de Nylon de 0,45 µm de diámetro de poro (WPH C – F). A continuación, se evaluaron diferentes tipos de cromatografía utilizando dicho hidrolizado pre-tratado como muestra de partida:

- **Cromatografía de filtración por geles** (GFC) utilizando una columna de dimensiones de 48 cm x 2,5 cm ( $V_c = 47$  ml) rellena con el gel Sephadex G-25 (GE, Upsala, Suecia), flujo de 0,5 ml min<sup>-1</sup> y volumen de siembra de 2,5 ml. La elución se realizó con buffer fosfato 50 mM pH 7.
- **Cromatografía de intercambio aniónico débil** (IEC – DEAE) empleando la resina DEAE-Sepharose FF ( $V_c = 7,5$  ml) con buffer fosfato 50 mM pH 7 como buffer de equilibrado. La elución se efectuó utilizando concentraciones crecientes de NaCl en forma escalonada adicionadas al buffer de partida desde 0,1 M hasta 2,5 M con un flujo de 1,65 ml min<sup>-1</sup> y un volumen de muestra de 50 ml recirculado durante 1 h hasta A (280 nm) constante (2,5 ml de muestra pre-tratada diluida 1/20 en el buffer de equilibrado).
- **Cromatografía de intercambio aniónico fuerte** (IEC – Q) donde la resina utilizada fue Q-Sepharose FF (GE;  $V_c = 7,7$  ml) y las condiciones cromatográficas de equilibrado y elución fueron las mismas que las mencionadas para el caso de IEC – DEAE.
- **Cromatografía de intercambio catiónico fuerte** (IEC – SP) empleando la resina SP-Sepharose FF (GE,  $V_c = 7,6$  ml) e iguales parámetros cromatográficos que los dos intercambios iónicos anteriores.
- **Cromatografía de interacción hidrofóbica** (HIC) empleando el gel Phenyl-Sepharose FF (GE,  $V_c = 5,3$  ml) equilibrada con una solución 3 M NaCl en buffer fosfato 50 mM pH 7. La muestra fue acondicionada agregando NaCl sólido hasta lograr la misma concentración que el buffer de partida y la elución fue hecha en forma escalonada empleando soluciones con concentraciones decrecientes de sal hasta eluir con buffer fosfato 50 mM pH 7.

En todas las cromatografías se recogieron fracciones de 3 ml y se determinó la absorbancia a 280 nm. En todos los casos, las fracciones obtenidas fueron recolectadas siguiendo el perfil de elución a 280 nm y luego se les midió la AAO.

Finalmente, todas las muestras fueron previamente tratadas con urea, filtradas (0,2 µm) y analizadas por RP-HPLC utilizando un equipo Waters con detector de absorbancia (214 nm), una columna VARIAN Microsorb MV 300-5 C18 (250 x 4,6 mm x ¼”), una temperatura de columna constante de 30°C, dos fases móviles (A: TFA 0,1% en agua y B: TFA 0,1% en acetonitrilo) y siguiendo el protocolo de acuerdo a lo descrito por Fenoglio y col. (2016). Los análisis estadísticos ANOVA fueron efectuados con el software STATGRAPHICS Centurion XV 15.2.06.

## RESULTADOS/DISCUIONES

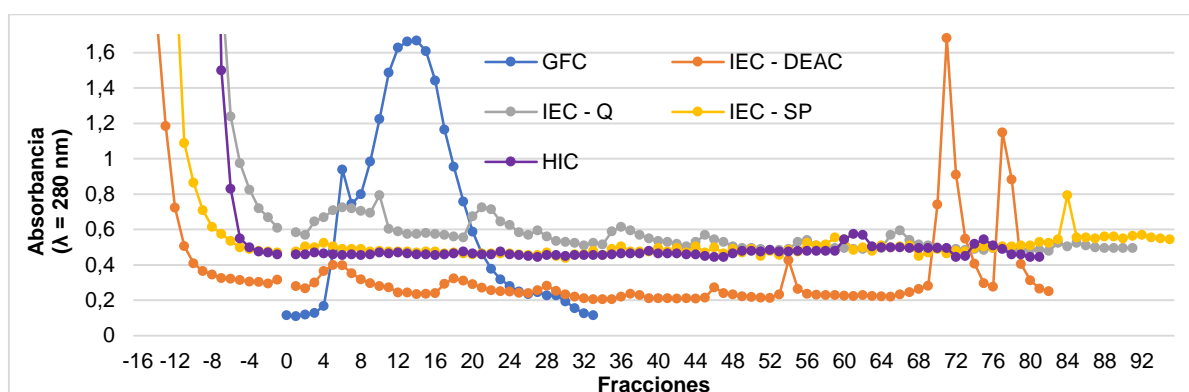
El hidrolizado obtenido (22,1% de grado de hidrólisis) presentó actividad antioxidante significativamente mayor que su control, en todas sus concentraciones y valores de pH evaluados (Tabla 1). Esto demuestra que la hidrólisis de proteínas aumenta la actividad funcional de las mismas como consecuencia de la liberación de péptidos, cuyas secuencias bioactivas están encriptadas para ejercer su acción en las condiciones nativas del lactosuero. En este sentido, los valores de AAO obtenidos por el hidrolizado a una concentración de 10 mg ml<sup>-1</sup> fueron similares al control 100 mg ml<sup>-1</sup>. Estos resultados se asemejan a los observados por Conway y col. (2013) quienes, a pesar de haber trabajado con hidrolizados de WPC obtenidos a partir de las enzimas pepsina y tripsina y haber determinado la AAO utilizando el radical libre ORAC<sub>FL</sub>, concluyeron que la hidrólisis permitió el aumento de la actividad evaluada.

**Tabla 1.** Actividad antioxidante del hidrolizado y su control a pH 7.

Muestra	Concentración (mg ml <sup>-1</sup> )*	TEAC (mM Trolox)
<b>Hidrolizado</b>	10	4,23±0,10 <sup>b</sup>
	30	10,79±1,29 <sup>c</sup>
	100	40,13±2,54 <sup>d</sup>
<b>Control</b>	10	0,81±0,13 <sup>a</sup>
	30	1,73±0,03 <sup>a</sup>
	100	5,13±0,29 <sup>b</sup>

\*: Efecto significativo (p<0,05). <sup>a-d</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05). Hidrolizado: hidrolizado del concentrado de suero lácteo (WPC-80). Control: concentrado del suero lácteo (WPC-80) sin hidrolizar. TEAC: capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox.

En la Figura 1, se observan los cromatogramas a 280 nm obtenidos empleando las distintas estrategias cromatográficas luego de utilizar el hidrolizado como muestra inicial. Del análisis de los mismos se observa la complejidad fisicoquímica de dicha suspensión, observándose fraccionamiento tanto por carga, como por tamaño e índice de hidrofobicidad.



**Figura 1.** Perfiles de elución obtenidos luego de fragmentar el hidrolizado empleando diferentes estrategias separativas.

En la Tabla 2, puede observarse que la AAO de las fracciones siempre resultó menor a la muestra inicial, fundamentalmente debido a que dicha actividad biológica es producida por un número considerable e indefinido de compuestos de origen proteico de bajo peso molecular. Al analizar los diferentes intercambios iónicos, es posible decir que fundamentalmente la AAO está asociada a fragmentos de carácter aniónico. Con respecto a su tamaño molecular, dado el intercambio que realizó con el Sephadex G-25, la actividad funcional está asociada a un rango de entre 600 y 3000 Da. Por otro lado, se apreció que los péptidos bioactivos no presentan una hidrofobicidad considerable al fraccionarlos en resinas de fenilo.

**Tabla 2.** Actividad antioxidante de las muestras parcialmente purificadas en relación a la suspensión hidrolizada de partida.

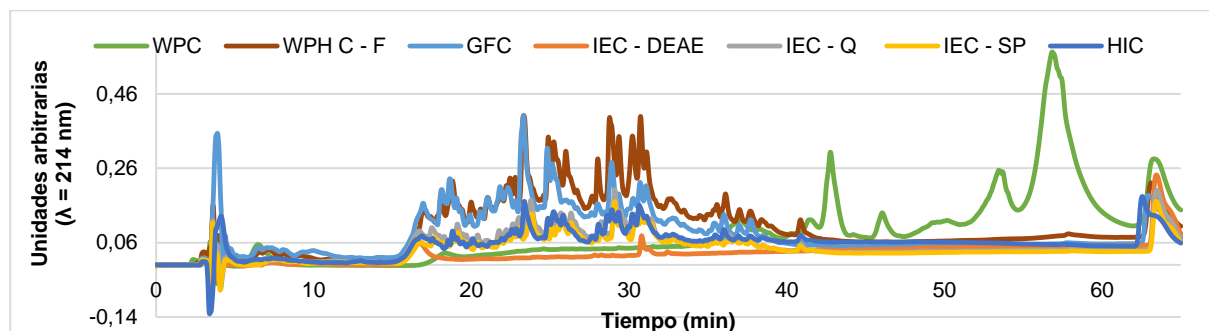
Muestra	TEAC (mM Trolox)	Proteína (µg)*
<b>WPH C – F</b>	0,0261±0,0031	1185,62±78,36
<b>GFC</b>	0,0057±0,0001	107,70±1,12
<b>IEC – DEAE</b>	0,0088±0,0020	25,5±0,46
<b>IEC – Q</b>	0,3416±0,0013	51,74±0,37
<b>IEC – SP</b>	0,0184±0,0008	58,32±0,50
<b>HIC</b>	0,0256±0,0017	107,70±1,61

\* Según el método del Ácido Bicinonínico (Walker, 2002).

Esto es muy beneficioso, teniendo en cuenta que los compuestos hidrofóbicos (y los aminoácidos categorizados como tal) son los causantes del amargor en productos lácteos y

derivados. De hecho, la fracción 0 presenta prácticamente la misma actividad que la muestra inicial, aunque 10 veces menos de contenido proteico, por lo que su AAO intrínseca resultó muy elevada. Así, esta muestra podría ser utilizada potencialmente como un aditivo alimentario para la elaboración de formulaciones nutraceuticas dada la posibilidad de separarla fácilmente de aquellos compuestos no deseables de ser incorporados.

Del análisis del RP-HPLC de las fracciones con mayor AAO se desprende que la bioactividad está asociada a una elevada cantidad de compuestos peptídicos de mediana a baja hidrofobicidad (tiempos de elución entre 20 y 35 min). Asimismo, las fracciones más activas fueron aquellas que resultaron no retenidas en las columnas cromatográficas, principalmente debido a la cantidad de estructuras peptídicas bioactivas, apreciado también por la similitud de tales muestras a aquella de partida (Figura 2). Aquella que mostró características diferentes fue la fracción N° 3 de la DEAE-Sepharose, la cual posee una concentración de proteínas muy baja y buena AAO, por lo que sería interesante continuar con la evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos involucrados utilizando técnicas de mayor complejidad que permitan profundizar el conocimiento de las estructuras. Estos resultados revelan que la complejidad química de los hidrolizados obtenidos se traslada directamente a la funcionalidad AAO observada en los mismos. Estos estudios representaron un excelente acercamiento para estudiar los fragmentos que podrían ocasionar la AAO observada, así como la factibilidad de poder aislar algunas de estas sustancias que podrían funcionar como aditivos alimentarios en preparaciones alimenticias de alto valor. Asimismo, las estrategias separativas deberán ser optimizadas de forma de lograr fracciones activas más puras con el fin de poder utilizarlas como ingredientes o aditivos que le aporten un beneficio a la salud del consumidor más allá de su poder nutricional.



**Figura 2.** Cromatogramas correspondientes a las fracciones parcialmente purificadas de mayor AAO y a sus controles (WPC y WPH C – F).

## BIBLIOGRAFÍA

- Conway V, Gauthier SF, Pouliot Y,** 2013. Antioxidant Activities of Buttermilk Proteins, Whey Proteins, and Their Enzymatic Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 364–372.
- Fenoglio CL, Vierling N, Manzo RM, Ceruti RJ, Sihufe GA, Mammarella EJ,** 2016. Whey protein hydrolysis with Free and Immobilized Alcalase®: Effects of operating parameters on the modulation of peptide profile obtained. *American Journal of Food Technology*, 11: 143-151.
- González Siso MI,** 1996. The Biotechnological Utilization of Cheese Whey: a Review. *Bioresource Technology*, 57: 1-11.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M Rice-Evans C,** 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231–1237.
- Walker JM,** 2002. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation, En: *The Protein Protocols Handbook*, Walker, J. M. (ed.), 2<sup>da</sup> edición, Humana Press Inc., Totowa, Nueva Jersey, pp. 11–14.