

# Obtención de hidrolizados de clara de huevo preparados con peptidasas serínicas de *Maclura pomifera*

**CORRONS, María Alicia (1); LIGGIERI, Constanza Silvina (1,2); COLOMBO, María Laura (1,3); BRUNO\*, Mariela Anahi (1,3). 1. CIPROVE, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, Centro asociado a la CICpBA, Argentina. 2. CICpBA, Argentina. 3. CONICET, Argentina. Email: brunomariela@biol.unlp.edu.ar.**

## INTRODUCCIÓN

Los hidrolizados proteicos poseen mayor digestibilidad que las proteínas de origen, por lo cual son utilizados para cubrir dietas especiales de adultos mayores, deportistas y en determinadas patologías. Por otra parte pueden contener péptidos bioactivos liberados durante el proceso de hidrólisis por la acción de peptidasas específicas. El presente trabajo tuvo como objetivo la obtención de proteasas serínicas a partir de látex de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid (Moraceae) y su empleo en la hidrólisis de proteínas de clara de huevo de gallina, con la finalidad de liberar péptidos bioactivos como posibles ingredientes de alimentos funcionales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Vegetal

*Maclura pomifera* (Raf.) Schneid (Moraceae), árbol ornamental denominado "Narango de Louisiana" u "Osage orange". Posee frutos globosos, color verde-amarillentos, de 8-12 cm de diámetro. Exuda látex que contiene peptidasas serínicas.

### Extractos Proteolíticos

Frutos maduros ► Incisiones superficiales con lanceta para provocar la exudación del látex. Recolectación sobre buffer fosfatos (0,1M, pH 6, EDTA y cys 5 mM).

► Centrifugación (10000 rpm, 4°C), filtración: **EXTRACTO CRUDO**  
► Precipitación con un volumen de etanol a -20 °C; centrifugación (10000 rpm, 30 min, 4°C) y resuspensión en un volumen del buffer de extracción: Extracto parcialmente purificado denominado **PER** (Precipitado etanólico redisoluelto). Determinaciones (**Tabla 1**).

- Concentración proteica (Bradford, 1976)
- Actividad caseinolítica (Bruno et al., 2010)
- Actividad Específica



### Sustrato Protelco

Un gramo de clara de huevo liofilizada se disolvió en 100 mL de agua destilada, presentando 8 mg/mL de proteínas, determinadas por el método de Lowry (Peterson, 1979); método de calibración de seroalbúmina: 50-400 mg/mL.

### Hidrolizados

Condiciones de reacción:

- Proporción enzima:sustrato: 1:9 volúmenes
- Agitación y temperatura: en shaker a 200 rpm y 45 °C
- Tiempos de hidrólisis: 30, 60, 90, 120 y 180 min
- Controles: CE, 1 volumen de agua + 9 de sustrato; CS, 1 volumen de enzima + 9 de agua. CM, sustrato y enzima preincubados y mezclados en la misma proporción que en los hidrolizados

### Monitoreo de las Hidrólisis

- Grado de Hidrólisis (**Tabla 2**): método del TNBS (Adler Nisen, 1979). Curva de calibración con leucina (0-2,5 mM, **Figura 1**)
- Cromatografía de Exclusión molecular (**Figura 2**, Superdex peptide, GE) Velocidad de flujo: 0,5 mL/min; Buffer fosfatos, 0,005M, pH 7,4
- Tricina-SDS-PAGE (**Figura 3**, Bruno et al., 2010). Patrones de peso molecular Low Range (GE)

### Actividades Biológicas

- Actividad Antioxidante: método del ABTS (**Figura 4**, Re et al., 1999) curva de trólox (0-2,5 mM).
- Actividad antihipertensiva: método fluorométrico de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Equipo: lector de placas TECAN, placa de 96 wells ;  $\lambda_{excitación}$ : 320 nm;  $\lambda_{emisión}$ : 420 nm; sustrato: AbzPheArgLys(DNP)Pro-OH (**Tabla 3**, Carmona et al., 2006).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

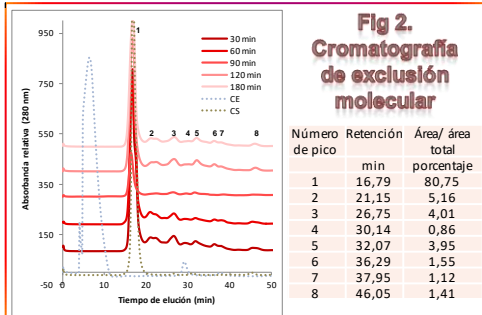
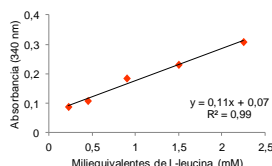
**Tabla 1. Caracterización de los Extractos**

	EC	PER
actividad caseinolítica (Ucas/mL)	6,197 ± 0,298	4,515 ± 0,300
concentración proteica (mg/mL)	1,53 ± 0,22	0,86 ± 0,04
actividad específica (Ucas/mg)	4,06 ± 0,61	5,23 ± 0,41

**Tabla 2. Grado de Hidrólisis**

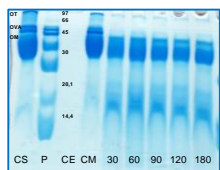
Tiempo de hidrólisis (min)	Grado de hidrólisis (%)
30	2,7 ± 0,7
60	2,6 ± 1,0
90	4,8 ± 1,6
120	4,8 ± 0,4
180	5,1 ± 0,4

**Fig 1. Curva de calibración de L-Leu**

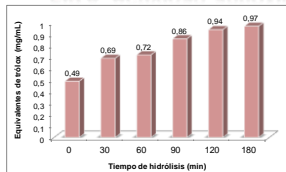


**Fig 3. SDS-PAGE (tricina)**

- CS: control de sustrato
- CE: control de enzima
- CM: control mixto
- P: marcadores de peso molecular "Low Range", GE
- OT: ovotransferrina
- OVA: ovalbúmina
- OM: ovomucoide



**Fig 4. Actividad antioxidante**



Los valores se encuentran expresados como equivalentes de trólox (mg/mL). El control de enzima (CE) exhibió un valor de 0,22mg/mL.

**Tabla 3. Actividad Inhibitoria de la ECA**

	Pendiente del gráfico de cinética (U.A./seg)	Porcentaje de actividad de la ECA	Porcentaje de inhibición de la ECA
Actividad máxima (ECA)	1,83 ± 0,15	100 %	0 %
Hidrolizado de 60 min	0,43 ± 0,04	23,50 %	76,50 %
Hidrolizado de 120 min	0,47 ± 0,04	25,70 %	74,30 %

## CONCLUSIONES

- ✓ A partir de látex de frutos de *M. pomifera* se obtuvieron dos extractos proteolíticos: el EC y el PER, que arrojaron valores de actividad caseinolítica de 6,197 ± 0,298 y 4,515 ± 0,300 Ucas/mL, concentración proteica de 1,53 ± 0,22 y 0,86 ± 0,04 mg/mL, y actividad específica de 4,06 ± 0,61 y 5,23 ± 0,41 Ucas/mg, respectivamente.
- ✓ El PER fue empleado para hidrolizar clara de huevo liofilizada y resuspendida a una concentración de 8 mg/mL de proteína.
- ✓ El máximo grado de hidrólisis alcanzado fue de 5%, a los 180 min de digestión.
- ✓ Por SDS-PAGE se observó con el avance del tiempo de hidrólisis una leve degradación de las proteínas ovalbúmina y ovomucoide, y la aparición de una amplia banda correspondiente a péptidos de aproximadamente 20 kDa.
- ✓ Esta banda proteica fue resuelta mediante cromatografía de exclusión molecular en 8 picos principales.
- ✓ La actividad antioxidante para el hidrolizado de 180 min fue de 0,97 ± 0,01 mg/mL de trólox, valor que corresponde a un 50% más que su control.
- ✓ El porcentaje de inhibición de la ECA fue de 76,5 y 74,3% para los hidrolizados de 60 y 120 min, respectivamente.
- ✓ Estos hidrolizados podrían ser utilizados como ingredientes funcionales de alimentos ya que presentan propiedades biológicas de interés en biotecnología alimentaria.

## REFERENCIAS

- ✓ Adler-Nissen (1979) "Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid" J. Agric. Food Chem. 27:1256-1262.
- ✓ Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72: 248-254.
- ✓ Bruno et al. 2010. Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from Bromelia hieronymi fruits". Food Sci. Technol., 43, 695-701.
- ✓ Carmona, Schwager, Juliano, Juliano, & Sturrock (2006) "A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay" Nature Protocols 1:1971-1976.
- ✓ Peterson 1979. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. Anal. Biochem. 100:201-220.
- ✓ Re et al. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med. 26:1231-1237.