

Salese, Lucía (1,2); Liggieri, Constanza. S. (1,3), Bruno Mariela A. (1,2). E-mail: lusalese@gmail.com

(1) CIPROVE, UNLP. Centro asociado a la CICPBA. La Plata, Buenos Aires, Argentina. (2) CONICET. Argentina. (3) CICPBA. Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

La hipertensión arterial es una enfermedad que disminuye la calidad y expectativa de vida. Se han estudiado péptidos que actúan sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), regulando la presión arterial. Dichos péptidos pueden ser obtenidos por hidrólisis de proteínas empleando enzimas proteolíticas. *Bromelia serra* es una especie que crece en el centro-norte de Argentina cuyos frutos poseen peptidasas de tipo cisteínico al igual que otras especies de la familia Bromeliaceae. El objetivo del presente trabajo consistió en preparar un extracto enzimático a partir de esta especie vegetal, utilizarlo para hidrolizar diferentes proteínas alimentarias y evaluar la presencia de péptidos inhibitorios de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA), la cual forma parte del sistema SRAA. Se obtuvo un extracto crudo (EC) empleando frutos inmaduros triturados en presencia de buffer cítrico-fosfato 0,1-0,2 M (pH 5, EDTA y cisteína 5mM). Este extracto fue purificado parcialmente por precipitación etanólica (-20 °C, 30 min), centrifugado (10.000 rpm, 4 °C, 30 min) y resuspendido en buffer de extracción, en un volumen igual al de partida. Esta preparación fue denominada PERBs y presentó una actividad caseinolítica de $0,9773 \pm 0,0936$ Ucas/ml y una concentración de proteínas de 328 ± 27 µg/ml. Se prepararon tres sustratos proteicos: aislado de soja (SOJ), lactosuero bovino (LAC) y caseína bovina (CAS) cuyas concentraciones proteicas fueron $5,1 \pm 0,6$ (SOJ), $9,36 \pm 0,2$ mg/ml (LAC) y $8,2 \pm 0,6$ (CAS) mg/ml. Se obtuvieron hidrolizados con los tres sustratos empleando el PERBs, en una proporción enzima:sustrato de 1:9, a 45 y 55 °C, durante diferentes tiempos de reacción (5, 10, 30, 60, 90 y 180 min), deteniendo las hidrólisis por shock térmico (100 °C, 5 min). Los controles utilizados fueron: tiempo cero de hidrólisis (T_0 , sólo sustrato) y blanco de enzima (BE, sólo enzima). Los hidrolizados fueron monitoreados por SDS-PAGE con tricina, observándose una degradación progresiva de los tres sustratos. Se obtuvieron valores de grado de hidrólisis mayores en los hidrolizados de 55 °C que aquellos correspondientes a 45 °C. Se alcanzaron los valores máximos luego de 180' de digestión, correspondiendo el mayor valor de porcentaje al hidrolizado de CAS ($32,2 \pm 0,8$ %), seguido por los hidrolizados de SOJ y LAC ($18,2 \pm 0,6$ y $12,0 \pm 0,8$ %, respectivamente). Se determinó la actividad inhibitoria de la ECA a todos los hidrolizados de 180' empleando un método fluorométrico utilizando como sustrato Abz-PheArgLys(DNP)Pro-OH. En todos los casos se observa un mayor porcentaje de inhibición de la ECA en los hidrolizados respecto de sus BE y T_0 , mostrando así la liberación de péptidos inhibitorios como resultado de las hidrólisis. El hidrolizado de LAC de 55 °C presentó el mayor porcentaje de inhibición ($57,5 \pm 3,6$ %), seguido por los hidrolizados de CAS de 45 y 55 °C ($53,8 \pm 2,0$ y $52,7 \pm 0,0$, respectivamente). Por lo tanto se considera que estos hidrolizados podrían ser empleados como ingredientes de alimentos funcionales formulados para regular la presión arterial.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha incrementado la prevalencia de la hipertensión arterial en los países occidentales. Es por esto que numerosas investigaciones se dirigen hacia la búsqueda de tratamientos para mejorar la calidad de vida de las personas afectadas. Se han estudiado péptidos que actúan sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), regulando la presión arterial. *Bromelia serra* es una especie vegetal nativa de Argentina cuyos frutos poseen peptidasas capaces de liberar péptidos bioactivos encriptados en proteínas alimentarias.

OBJETIVOS

Preparar un extracto enzimático a partir de frutos de *B. serra*.

Emplear el extracto purificado parcialmente para hidrolizar diferentes proteínas alimentarias.

Evaluar la presencia de péptidos inhibitorios de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del extracto enzimático

- **Extracto crudo (EC)**
 - Buffer cítrico-fosfato (0,1-0,2 M de pH 5, EDTA y Cys 5 mM)
 - Centrifugación (10.000 g, 30', 4 °C)
 - Recuperación del sobrenadante (EC)
- **Purificación parcial**
 - Precipitación con 4 volúmenes de etanol
 - Centrifugación (10.000 g, 30', 4 °C)
 - Resuspensión del pellet en buffer de extracción → **PER-Bs** ($0,9773 \pm 0,0936$ Ucas/ml, 328 ± 27 µg proteína/ml)

Frutos inmaduros
B. serra

Obtención de los hidrolizados

- **Sustratos proteicos**
 - Proteína aislada de soja (SOJ): $5,1 \pm 0,6$ mg/ml
 - Proteínas de lactosuero bovino (LAC): $9,4 \pm 0,2$ mg/ml
 - Caseína bovina (CAS): $8,2 \pm 0,6$ mg/ml
- **Condiciones de hidrólisis**
 - Proporción enzima:sustrato, 1:9
 - Temperatura: 45 y 55 °C
 - Tiempos de hidrólisis: 0, 5, 10, 30, 60, 90 y 180 min
 - Agitación: 200 rpm
 - Inactivación enzimática: 100 °C, 5 min

Caracterización de los productos de hidrólisis

- **SDS-PAGE con Tricina**
- **Grado de hidrólisis:** método del TNBS
- **Actividad inhibitoria de la ECA (AIECA):**
 - Sustrato fluorogénico: Abz-PheArgLys(DNP)Pro-OH 0,05 mM en DMSO
 - Buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 7, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 µM
 - Tiempo de reacción: 0-290 s

RESULTADOS

Figura 1

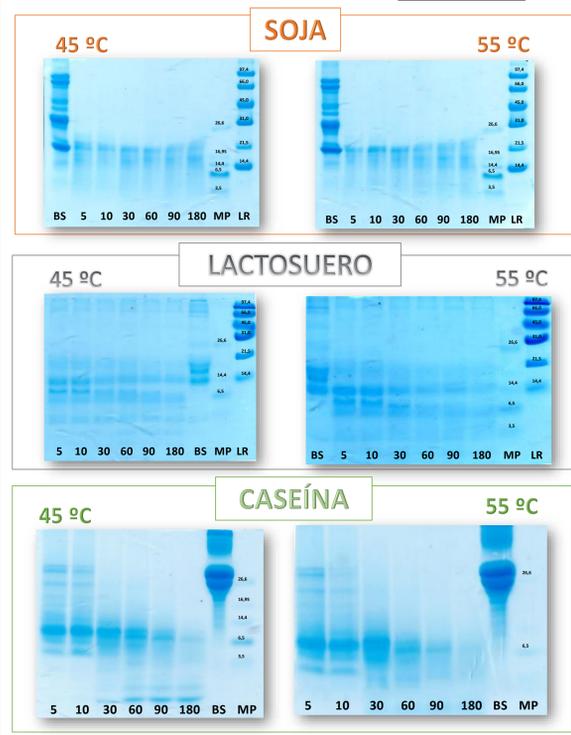


Figura 1. SDS-PAGE con tricina. Hidrolizados de soja, lactosuero y caseína de 45 y 55 °C. BS: sustrato. Tiempos de hidrólisis: 0-180'. Patrones de peso molecular (BioRad): multipéptido (MP) y "Low Range" (LR).

Figura 2

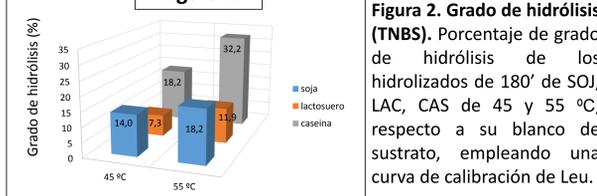


Figura 2. Grado de hidrólisis (TNBS). Porcentaje de grado de hidrólisis de los hidrolizados de 180' de SOJ, LAC, CAS de 45 y 55 °C, respecto a su blanco de sustrato, empleando una curva de calibración de Leu.

Figura 3

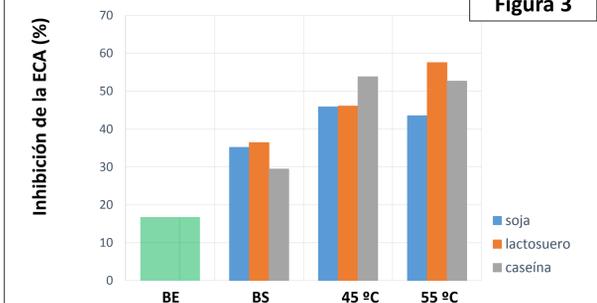


Figura 3. Actividad inhibitoria de la ECA (AIECA). Porcentaje de inhibición respecto a la actividad de la enzima total (100%). BE, Blanco de enzima (sin sustrato). BS, Blanco de sustrato (sin enzima). Hidrolizados de 180' de soja, caseína y lactosuero, de 45 y 55 °C.

CONCLUSIONES

- Empleando el PER-Bs, se obtuvo la degradación progresiva de SOJ, LAC y CAS, en las condiciones ensayadas.
- Para los hidrolizados de 180 minutos, el mayor porcentaje de grado de hidrólisis corresponde al hidrolizado de CAS ($32,2 \pm 0,8$ %), seguido por los hidrolizados de SOJ y LAC ($18,2 \pm 0,6$ y $12,0 \pm 0,8$ %, respectivamente).
- Todos los hidrolizados de 180 minutos mostraron mayor porcentaje de inhibición de la ECA respecto de sus BE y BS, por ello se infiere que el proceso favoreció la liberación de péptidos inhibitorios.
- El hidrolizado de LAC de 55 °C presentó el mayor porcentaje de inhibición de la ECA ($57,5 \pm 3,6$ %), seguido por los hidrolizados de CAS de 45 y 55 °C ($53,8 \pm 2,0$ y $52,7 \pm 0,0$, respectivamente).
- Consideramos que los hidrolizados con mayor AIECA podrían ser empleados como ingredientes de alimentos funcionales formulados para regular la presión arterial.

BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Nissen 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 1256e1262.
- Aleixandre A., Miguel M. & Muguerza B., 2008. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de leche y huevo. *Nutr. Hosp.* 23:313-318.
- Caffini N., 1988. Proteasas de Bromeliaceae. IV. Aislamiento de una Fitoproteasa Sulfhidrídica presente en Frutos de *Bromelia serra* Griseb. *Acta Farm. Bonaerense.* 7(1):9-14
- Carmona et al. 2006. A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. *Nature Protocols*, 1, 1971e1976.
- Chen, Z. Y., Peng, C., Jiao, R., Wong, Y. M., Yang, N., & Huang, Y. (2009). Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(11), 4485-4499.
- Hong F., Ming L., Yi S., Zhanxia L., Yongquan W. & Chi L., 2008. The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs?. *Peptides.* 29:1062-1071.
- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685
- Natalucci, C. L., Brullo, A., Lo'pez, L. M. I., Hilal, R., & Caffini, N. O. (1996). Macrodonin, a new protease isolated from fruits of *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Journal of Food Biochemistry*, 19, 443-454.