

Estudio comparativo de la actividad antioxidante de hidrolizados de proteínas alimentarias empleando dos variantes del método del ABTS



Salese* L (1,2), Liggieri CS (1,3), Bruno MA (1,2)

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



Introducción

Los ROSs (reactive oxygen species) inician reacciones que dañan moléculas biológicas pudiendo provocar diversas patologías. Son generados por el organismo o pueden ser incorporados a partir de fuentes exógenas. Por otra parte, causan deterioro en alimentos durante su procesamiento y almacenamiento, especialmente a través de la oxidación de lípidos. Algunos antioxidantes sintéticos como el BHT y el BHA son empleados en la industria alimentaria, pero actualmente su uso está siendo cuestionado porque podrían provocar daño hepático. Actualmente numerosas investigaciones están direccionadas a encontrar antioxidantes que contengan péptidos bioactivos antioxidantes liberados por hidrólisis enzimática de proteínas alimentarias.

Objetivos

- Obtener un extracto proteolítico a partir de frutos de *Bromelia serra*.
- Utilizarlo para hidrolizar caseínas y proteínas de lactosuero y de soja
- Determinar actividad antioxidante en los hidrolizados empleando dos variantes del método del ABTS.

Materiales y métodos

Frutos de *Bromelia serra* Griseb.
Bromeliaceae, Pcia. de Entre Ríos



Extracto proteolítico crudo
Buffer cítrico-fosfato 0,1-0,2 M de pH 5
EDTA y cisteína 5 mM

Precipitación etanólica
(4 volúmenes de etanol, -20 °C)

Centrifugación
1000 rpm, 30 min, 4 °C

Resuspensión en buffer de extracción

1. Extracto proteolítico parcialmente purificado

Actividad específica: 2,97±0,38 Ucas/mg

2. Sustratos proteicos para hidrólisis

* AISLADO PROTEICO DE SOJA (SOJ)

5,1±0,6 mg/ml

* LACTOSUERO BOVINO (LAC)

9,4±0,2 mg/ml

* CASEÍNA BOVINA (CAS)

8,2±0,6 mg/ml.

3. Condiciones de hidrólisis

* Proporción enzima:sustrato: 1:9

* Temperaturas: 45 y 55 °C

* Inactivación enzimática: shock térmico (100 °C, 5')

* Tiempos de digestión: 5'-180'

* Agitación: 200 rpm

4. Seguimiento de las hidrólisis

* SDS-PAGE (tricina)

* Grado de hidrólisis (método del TNBS)

5. Determinación de actividad antioxidante

Reactivo radical catiónico ABTS^{•+}: 29 mg; persulfato de potasio: 5 mg; agua: 7,6 ml; 16 h en oscuridad; dilución con buffer fosfatos 5 mM, pH 7,4 hasta A_{734nm} final= 0,70±0,02

a) Método original

* Muestra: 2 µl; reactivo:198 µl (microplaca de 96 wells)

* Lectura: A_{734nm} luego de 30 min a 25 °C

* Curva de calibración de Trólox: 0,025-2,5 mg/ml

b) Método "quencher"

* Muestra: 10 µl; reactivo: 1 ml

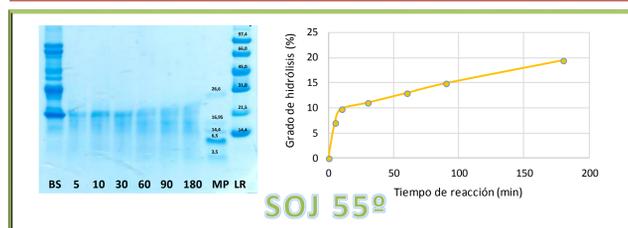
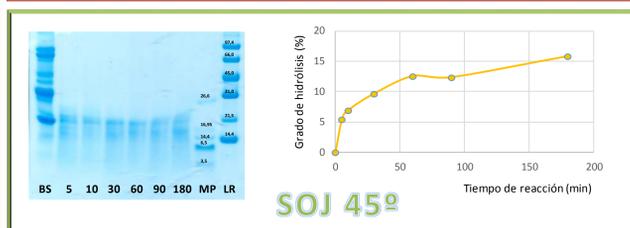
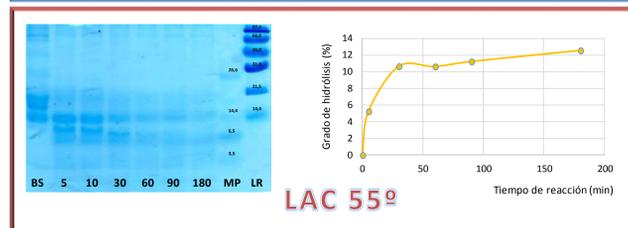
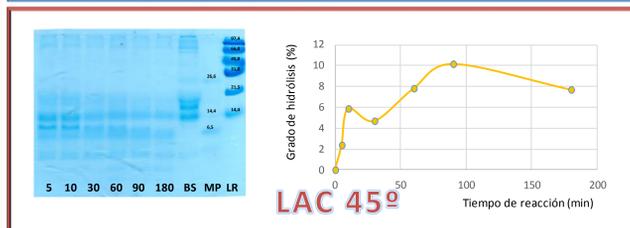
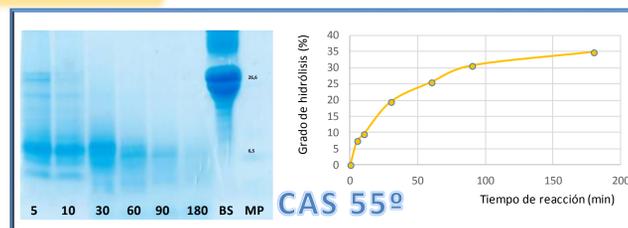
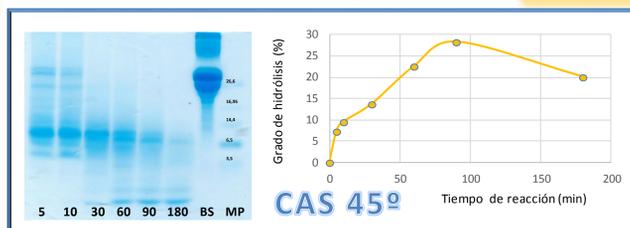
* Incubación: 30', 25 °C, 232 rpm

* Centrifugación: 15', 10.000 rpm

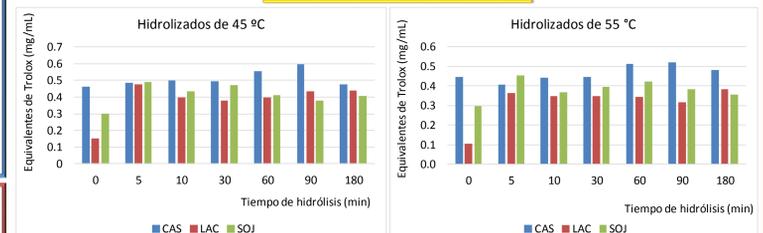
* Lectura: A_{734nm} de los sobrenadantes

* Curva de calibración de Trólox: 0,05-0,85 mg/ml

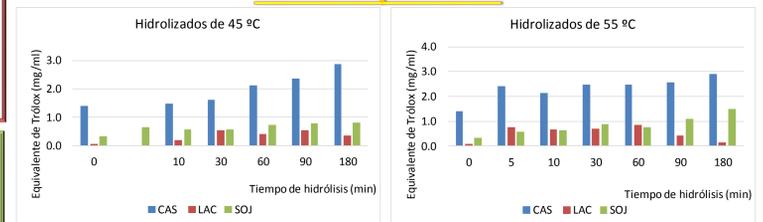
Resultados



Actividad antioxidante (ABTS) método tradicional



método quencher



- * Valores de actividad antioxidante mayores para el método quencher
- * Mayor actividad antioxidante en los hidrolizados de 55 °C que en los de 45 °C para el método quencher
- * Valores máximos obtenidos:

CAS 180 min: 2,89 ±0,12 mg/ml de Trólox

SOJ 180 min: 49±0,09 mg/ml de Trólox

LAC 60 min: 0,86±0,05 mg/ml de Trólox

Tricine-SDS PAGE y Grado de hidrólisis (método del TNBS). Hidrolizados de caseína, soja y lactosuero de 45 y 55 °C. BS: sustrato. Tiempos de hidrólisis: 0-180'. Patrones de peso molecular (BioRad): multipéptido (MP) y "Low Range" (LR).

Conclusiones

➤ A partir de frutos de *Bromelia serra* se preparó un extracto proteolítico, parcialmente purificado por precipitación etanólica, que presentó un valor de actividad específica de 2,97±0,38 Ucas/mg.

- Los hidrolizados de 55 °C resultaron tener mayores valores de actividad antioxidante que los correspondientes a 45 °C.
- Los valores máximos obtenidos de actividad antioxidante fueron de 2,89 ±0,12 mg/ml de Trólox para los hidrolizados de caseína de 180 min; 1,49±0,09 mg/ml de Trólox para los correspondientes a soja de 180 min y 0,86±0,05 mg/ml de Trólox para aquellos de lactosuero de 60 min.

* Los valores de actividad antioxidante obtenidos por el método "quencher" resultaron ser mayores que los obtenidos por el método original. Estos resultados sugieren que esta situación podría deberse a la liberación de péptidos antioxidantes atrapados dentro de agregados proteicos de los hidrolizados, hecho favorecido por la agitación constante en presencia del reactivo.

* De este modo, a partir de los resultados obtenidos, se infiere que los hidrolizados obtenidos podrían emplearse como ingredientes en alimentos funcionales o como aditivos para retrasar la oxidación natural.

Bibliografía

- Bertucci, Liggieri, Colombo, Vairo Cavalli, Bruno (2015). Application of peptidases from *Maclura pomifera* fruit for the production of active biopeptides from whey protein. *LWT-Food Sci. Technol.* 64:157-163.
- Caffini, Natalucci, Priolo, Buttazzoni (1988). Proteasas de Bromeliaceae. IV. Aislamiento de una fitoproteasa sulfhidrúlica presente en frutos de *Bromelia serra* Griseb. *Acta Farm. Bonaerense*, 7:9-14.
- Nielsen, Petersen, Dambmann (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Food Chem. Toxicol.* 66:642-646
- Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang, Rice-Evans (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26:1231-1237
- Serpen, A., Gökmena, V., & Fogliano, V. (2012). Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Science*, 90(1), 60-65.