

## HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS DE CONCENTRADO PROTEICO DE LACTOSUERO: ESTUDIO DEL PERFIL PEPTÍDICO, PROPIEDADES FUNCIONALES Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

VIERLING, Noelia E.<sup>1</sup>

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

*E-mail: [vierlingnoelia@hotmail.com](mailto:vierlingnoelia@hotmail.com)*

**Palabras claves:** Proteínas de suero lácteo

**Área temática:** Ingenierías

**Sub-área:** Alimentos

**Grupo:** X

### INTRODUCCIÓN

Las proteínas del lactosuero poseen un valor biológico superior al de otras proteínas (Sinha y col., 2007) por su contenido en leucina, triptófano, lisina, y aminoácidos azufrados. Muchas fracciones peptídicas de las proteínas del suero se consideran antigénicas y capaces de inducir respuestas inmunes (Duan y col., 2014), siendo los principales alérgenos la  $\alpha$ -lactoalbúmina y la  $\beta$ -lactoglobulina, y en menor cantidad las inmunoglobulinas y seroalbúminas. Los problemas de alergenicidad pueden reducirse o eliminarse por hidrólisis de las diferentes fracciones proteicas (Fenoglio y col., 2011). Además, al controlar las condiciones de reacción durante la hidrólisis enzimática de las proteínas de la leche, se obtienen fracciones que presentan mejor solubilidad y capacidad de emulsión, mejores propiedades espumantes, aumento de la poder de gelificación, reducción del sabor amargo y aumento del contenido de péptidos bioactivos (Smytha y FitzGerald, 1998). En síntesis, la modificación de la estructura nativa de las proteínas mediante hidrólisis enzimática permite mejorar las propiedades funcionales y nutricionales del alimento original sin alterar su valor nutritivo (Fenoglio, 2013). El objetivo del presente estudio fue estudiar los perfiles de los péptidos obtenidos al hidrolizar un concentrado proteico de lactosuero y evaluar algunas de sus características funcionales y nutricionales.

### METODOLOGÍA

#### Preparación de los hidrolizados

Los hidrolizados se obtuvieron colocando un volumen conocido (60ml) de solución de concentrado proteico de lactosuero (WPC80) al 7% (p/v) de proteína dentro de un reactor tipo Batch con agitación y control de pH y temperatura. La reacción comenzó con el agregado de 50 $\mu$ l enzima Alcalasa 2.4L (EC 3.4.21.62) de *Bacillus licheniformis* (Novozymes). La reacción se llevó a cabo a 50°C y el pH se mantuvo constante mediante la adición de NaOH 0,5N de manera manual por goteo desde una bureta, midiendo el consumo de NaOH 0,5N cada minuto durante los primeros 10 minutos, luego cada 2 minutos hasta los 30 minutos y por último cada 5 minutos hasta finalizar el tiempo de reacción. Previo a la obtención de hidrolizados, se realizaron experiencias para obtener curvas que relacionen el grado de hidrólisis (DH) en función del volumen de NaOH 0,5N empleado para mantener constante el pH del medio de reacción. El DH se calculó a partir del consumo de hidróxido de sodio añadido para mantener constante el pH durante la hidrólisis (Fenoglio, 2013):

---

<sup>1</sup> El presente trabajo es parte de una beca de iniciación a la investigación para estudiantes de carreras de grado de la UNL (Cientibeca) bajo el título de "Estudio de las propiedades funcionales y nutricionales de hidrolizados de proteína láctea para evaluar su uso en la formulación de una bebida fortificada". Director: SIHUFÉ, Guillermo A. - Co-Director: MAMMARELLA, Enrique J.

$$\%DH = 100 \times B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{M_p} \times \frac{1}{H_{total}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde B es el volumen de NaOH requerido para mantener constante el pH en mililitros;  $N_b$  es la normalidad del NaOH;  $M_p$  es la masa de proteínas en la muestra en gramos;  $h_{total}$  es el número total de uniones peptídicas en el sustrato (para WPC  $h_{total} = 8,8$ );  $\alpha$  es el grado de disociación promedio de los grupos  $\alpha$ -amino liberados en la hidrólisis. A su vez, el valor de  $\alpha$  se calculó como:

$$\alpha = \frac{10^{(pH-pK)}}{1+10^{(pH-pK)}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Siendo,  $pK$ :

$$pK = 3,8 + 0,45 \times pH \quad \text{Ecuación 3}$$

Al finalizar cada experiencia, la enzima residual se inactivó térmicamente sumergiendo la solución en un baño a 100 °C durante 3 minutos. Luego se almacenaron en freezer a -20 °C hasta posteriores análisis. Se obtuvieron hidrolizados con 3 grados de hidrólisis (DH) diferentes (5, 8 y 11%) a 2 pH distintos (8 y 10). Las experiencias se realizaron por duplicado. Además, se obtuvieron los blancos de reacción en ensayos donde no se agregó enzima.

### **Análisis de los hidrolizados por RP-HPLC**

Para el análisis cromatográfico se utilizó una columna para cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC). Las corridas se llevaron a cabo a una temperatura de 30°C, con un caudal de 1 ml min<sup>-1</sup>, fijando la longitud de onda del detector en 214 nm. Para las separaciones se utilizó como solvente A 0,1% TFA en agua y como solvente B 0,1% TFA en acetonitrilo, siguiendo el gradiente propuesto por Fenoglio y col., (2011). El equipamiento utilizado para realizar el análisis fue un sistema cromatográfico Waters (Waters Corporation, Estados Unidos).

### **Generación de espuma y estabilidad de la espuma obtenida**

Se utilizó el método de batido para generar la espuma, utilizando un homogeneizador de laboratorio Ultra-Turrax T25 (IKA Werke, Alemania). Para ello, una alícuota de 4 ml de hidrolizado se colocó en un tubo graduado sumergido en un baño de agua a temperatura ambiente para evitar el calentamiento durante el batido. Los ensayos se realizaron a 11.500 rpm durante 2 minutos. Luego de obtenida la espuma, el homogeneizador se retiró cuidadosamente para minimizar la rotura de espuma e inmediatamente se midió el volumen de líquido y el volumen total. Posteriormente, la estabilidad de la espuma se determinó en forma visual mediante el seguimiento de la evolución del drenaje de líquido y el correspondiente colapso de las burbujas de la fase espumosa durante 30 minutos, registrando los valores cada 5 minutos.

### **Capacidad antibacteriana**

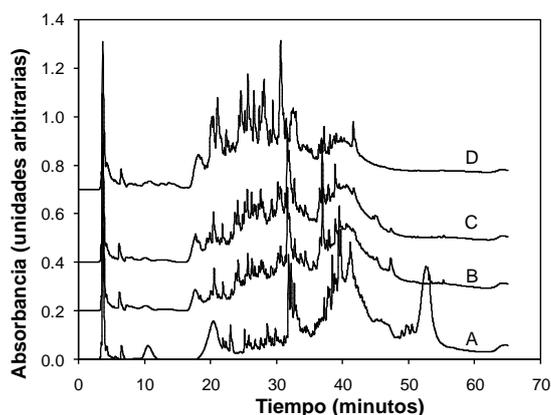
Con el fin de explorar la presencia de péptidos con actividad antimicrobiana en los hidrolizados obtenidos, se llevaron a cabo algunos ensayos preliminares utilizando el método de difusión en agar (Tagg y Mc Given, 1971). Para tal fin, 60  $\mu$ L de cada extracto previamente llevado a pH neutro se colocaron en orificios de 7 mm de diámetro presentes en placas con 15 ml de agar nutritivo inoculadas con el microorganismo cuya sensibilidad se pretende determinar (concentración final de 1-5 x 10<sup>6</sup> UFC/mL). Las placas se incubaron a 37°C durante 16-24 horas, procediendo luego a medir el diámetro de los halos de inhibición. Para estas pruebas preliminares de actividad inhibitoria se utilizaron las bacterias: *Escherichia coli* DBFIQ Ec 9, *Bacillus*

*cereus* DBFIQ B 28, *Bacillus subtilis* DBFIQ BS 23, *Listeria monocytogenes* LM4. Las mismas fueron obtenidas a partir de un cultivo stock a  $-80^{\circ}\text{C}$  y resembradas en forma sucesiva dos veces de manera de lograr cultivos axénicos en su fase exponencial de desarrollo. Los resultados fueron expresados a través de la medida de los diámetros de los halos de inhibición (mm).

## RESULTADOS

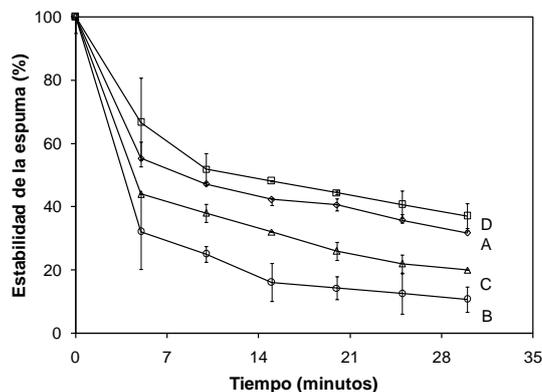
Del análisis de las **curvas de calibración** obtenidas, se observó que a pH 10 la reacción ocurría a mayor velocidad de hidrólisis, probablemente relacionada con su proximidad al pH óptimo de actividad de la enzima. En este sentido, con ambos pH de trabajo resultó posible obtener DH de 5 y 8%, pero a un DH de 11% solo se llegó con la corrida experimental a pH 10.

Los **perfiles cromatográficos** de los hidrolizados mostraron una importante presencia de picos de carácter hidrofílico (aquellos menor tiempo de retención), y se observó una desaparición en el pico correspondiente a las lactoglobulinas (entre los 50-60 min de corrida) en todos los grados de hidrólisis de trabajo. Además, cabe destacar se no se observaron picos fuertemente hidrofóbicos (zona final de los cromatogramas), lo cual es sumamente interesante para descartar la presencia de péptidos asociados al desarrollo de sabor amargo los cuales podrían ejercer un impacto negativo sobre los diferentes sistemas alimenticios en los cuales podrían ser incorporados. En la Figura 1 se observan algunos de los cromatogramas característicos.



**Figura 1.** Cromatogramas correspondientes a muestras de hidrolizados a pH 10. A: blanco; B: DH5; C: DH8; D: DH11.

Las **curvas de estabilidad de la espuma obtenida** (expresada como un porcentaje del correspondiente valor inicial) presentaron un comportamiento similar para los diferentes hidrolizados, observándose una fuerte caída en la estabilidad durante los primeros minutos posteriores a la finalización del batido. Además, los volúmenes de espuma obtenidos para los hidrolizados fueron menores (o similares en el caso de las muestras con DH = 11%) a los correspondientes a las muestras sin hidrolizar, lo cual podría representar un aspecto a destacar a la hora de pensar en incorporar los hidrolizados en matrices alimenticias bebibles. En la Figura 2 se observan curvas típicas de estabilidad de espuma.



**Figura 2.** Promedio y desviaciones estándar de los valores de estabilidad de espuma obtenidos durante 2 minutos de batido y a pH 10. A: blanco; B: DH5; C: DH8; D: DH11.

Finalmente, las pruebas de **inhibición de crecimiento bacteriano** han mostrado resultados dispares en función de la cepa testada: por un lado, no se ha observado inhibición del crecimiento para las cepas de *B. subtilis* y *B. cereus* para las diferentes muestras ensayadas, mientras que si se han observado halos de inhibición para las cepas de *E. coli* y *L. monocytogenes*. En el caso de *E. coli*, los diferentes extractos de hidrolizados obtenidos tanto a pH 8 como a pH 10 han mostrado aptitud para inhibir su crecimiento, registrándose halos de inhibición de hasta 18 mm. En el caso particular de *L. monocytogenes*, se registraron halos de inhibición de hasta 12 mm y solo en aquellos extractos de hidrolizados obtenidos a pH 10 y para DH de 8 y 11%. Si bien los resultados son muy alentadores, en estos momentos se está diagramando una nueva fase de este estudio que incorpore otras cepas potencialmente patógenas no utilizadas en las experiencias preliminares.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio, se evaluaron las características de los perfiles peptídicos y de de espumado, así como también la presencia de actividad antibacteriana en extractos provenientes de hidrolizados de WPC. Los resultados obtenidos son sumamente alentadores a la hora de pensar en utilizar hidrolizados de proteína de suero lácteo para formular nuevos alimentos o bebidas nutricionalmente enriquecidas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Duan, C., Yang, L., Li, A., Zhao, R., Huo, G., 2014. Effects of Enzymatic Hydrolysis on the Allergenicity of Whey Protein Concentrates. Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology, 13(4): 231-239.
- Fenoglio, C., 2013. Producción de hidrolizados enzimáticos de concentrado proteico de lactosuero (WPC) para la formulación de alimentos especiales. Tesis Doctoral de la Facultad de Ingeniería Química (UNL), Santa Fe, Argentina.
- Fenoglio, C.L., Sihufe, G.A., Rubiolo, A.C. y Mammarella, E.J., 2011. Determinación de condiciones operativas que contribuyen a minimizar la aparición de sabor amargo en hidrolizados de WPC. XIII Congreso CYTAL, Buenos Aires, Argentina.
- Sinha, R., Radha, C., Prakash, J., Purnima, K., 2007. Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. Food Chemistry, 101, 1484-1491.
- Smyth, M., FitzGerald, R.J., 1998. Relationship between some characteristics of WPC hydrolysates and the enzyme complement in commercially available proteinase preparations. International Dairy Journal, 8: 819-827.
- Tagg, J.R., Mc Given, A.R., 1971. Assay systems for bacteriocins. Applied and Environmental Microbiology, 21: 943-947.