

# “REVALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA LÁCTEA EMPLEANDO REACCIONES ENZIMÁTICAS: PRODUCCIÓN DE HIDROLIZADOS Y ESTUDIO DE PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE INTERÉS PARA LA SALUD Y NUTRICIÓN HUMANA”

**Eberhardt Agustina**

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

*Director: Sihufe Guillermo*

*Co-director: Manzo Ricardo*

**Área: Ingeniería**

## INTRODUCCIÓN

El suero de leche es un subproducto lácteo obtenido por la precipitación de la caseína en la fabricación de quesos; contiene más del 50% de los sólidos de la leche, incluyendo proteínas, lactosa, minerales y vitaminas (Hernández-Rojas y Vélez-Ruiz, 2014). Se ha considerado que las proteínas del suero son fuentes importantes de péptidos bioactivos definidos como secuencias específicas de aminoácidos que promueven un impacto positivo en los sistemas del cuerpo humano. Dichos péptidos pueden presentar actividad antioxidante, antihipertensiva y antimicrobiana, entre otras. Más allá de las propiedades biológicas presentes en las proteínas intactas, la hidrólisis puede liberar péptidos con mayor bioactividad (de Castro y col., 2017).

## OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo fueron obtener hidrolizados enzimáticos a partir de concentrado de proteína de suero lácteo por acción de una endopeptidasa comercial de uso habitual en la industria alimenticia, caracterizarlos y evaluar la presencia de posibles efectos biológicos.

## METODOLOGÍA

### 1. Obtención y acondicionamiento de los hidrolizados de proteína de suero (WPH)

Los hidrolizados enzimáticos se obtuvieron a partir de una solución de concentrado de proteínas de suero (WPC 80, Arla Foods, Argentina) al 7% (m/v) de proteínas. La enzima empleada fue Alcalasa™ 2.4L (EC 3.4.21.62) de *Bacillus licheniformis* (Novozymes, Dinamarca). Las condiciones de trabajo fueron preestablecidas de modo de lograr un grado de hidrólisis del 13%, asegurando minimizar los problemas de alergenicidad asociados a las proteínas del lactosuero. La reacción de hidrólisis se llevó a cabo utilizando el método del pH-stato (Adler-Nissen, 1986), empleando un reactor tipo Batch agitado con control de pH y temperatura. La misma comenzó con el agregado de la enzima sobre la solución de WPC que se encontraba en agitación en el reactor a 50°C y a pH 9, con una relación E/S (v/v) de 1/1200. El pH se mantuvo constante a lo largo de toda la reacción mediante la adición de NaOH 0,5 N, deteniéndose la reacción al lograr el DH deseado (a través de la medida del volumen de base consumido). Inmediatamente, las muestras fueron sometidas a 95°C por 5

Trabajo desarrollado en el marco de una **Cientibeca** (UNL 2016/2017) y del **Trabajo Final de Lic. en Nutrición** (TFLN, defendido el 20/03/2018); dentro del siguiente proyecto:

- **Título del proyecto:** “Alternativas de elaboración de productos lácteos para mejorar su producción y sus características nutricionales”
- **Instrumento:** CAI+D
- **Año convocatoria:** 2011
- **Organismo financiador:** UNL
- **Director:** Dr. Guillermo A Sihufe

min para lograr la inactivación térmica de la enzima. Además, se realizaron los correspondientes blancos de reacción empleando las mismas condiciones operativas del ensayo de hidrólisis, aunque omitiendo el agregado de la enzima y su consecuente inactivación térmica. Los hidrolizados obtenidos fueron acondicionados para su posterior caracterización y evaluación. Para ello, se evaluaron etapas de centrifugación, filtración y liofilización, de manera tal de estudiar la influencia de cada una de ellas sobre las características y la composición del extracto obtenido. En este sentido, las fracciones (F) de estudio fueron 5, entre ellas: F1: WPC sin tratar; F2: control sin hidrolizar; F3: WPH sin tratamiento posterior; F4: WPH centrifugado y; F5: WPH centrifugado y filtrado.

## 2. Caracterización de los hidrolizados obtenidos

La determinación del contenido de proteínas y el análisis del perfil peptídico se llevó a cabo a todas las fracciones obtenidas, mediante el método de nitrógeno total de Kjeldahl utilizando un equipo semiautomático Büchi 430 (Büchi, Flawil, Suiza) y cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) (Fenoglio y col., 2016), respectivamente. El estudio de las propiedades bioactivas se realizó a las fracciones control (F2) y de WPH centrifugado y filtrado (F5), mediante la determinación de la actividad antimicrobiana, antihipertensiva y antioxidante. La actividad antimicrobiana se determinó mediante el método de difusión en agar (Tagg y Mc Given, 1971) modificado por Cardoso y col. (2012). La actividad antihipertensiva se evaluó a través de la actividad inhibitoria sobre la enzima convertidora de la angiotensina I (ECA), empleando el método espectrofotométrico descrito por Cian y col. (2011). La actividad antioxidante se determinó mediante la metodología descrita por Re y col. (1999), basada en la eliminación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup>.

## 3. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se usó ANOVA, de manera tal de evaluar la influencia de diferentes factores tales como el proceso de hidrólisis, la concentración de los extractos y el pH del medio sobre las diferentes variables de estudio. Cuando el efecto de los mismos fue significativo ( $P < 0,05$ ), se realizó una comparación de medias por el método LSD. Para ello, se utilizó el software Statgraphics (Statgraphics Inc., Rockville, MD, Estados Unidos).

## RESULTADOS

Los correspondientes **contenidos de nitrógeno expresado como proteína láctea** de cada fracción analizada, se muestran en la Tabla 1.

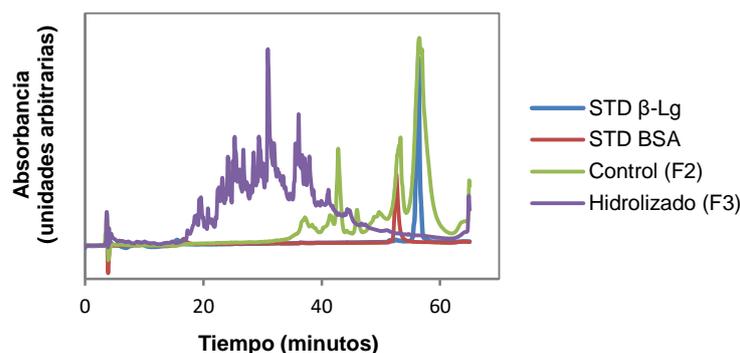
**Tabla 1.** Valores promedios y desviaciones estándar correspondientes al contenido de nitrógeno determinado por el método Kjeldahl.

Fracción (F)	N expresado como proteína láctea (%)
F1	6,72 ± 0,02 <sup>b</sup>
F2	7,19 ± 0,12 <sup>c</sup>
F3	6,09 ± 0,00 <sup>a</sup>
F4	6,23 ± 0,29 <sup>a</sup>
F5	6,30 ± 0,05 <sup>a</sup>

**F1:** WPC sin tratar; **F2:** control sin hidrolizar; **F3:** WPH sin tratar; **F4:** WPH centrifugado; **F5:** WPH centrifugado y filtrado. <sup>a-c</sup> Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

Se puede apreciar que las soluciones de WPC (F1 y F2) fueron las que presentaron mayor contenido proteico. El menor contenido de proteína láctea de las fracciones de hidrolizados podría deberse a una reacción suave de desaminación tanto de péptidos y aminoácidos libres como de ciertas sustancias nitrogenadas no proteicas, producida por la hidrólisis junto

al tratamiento térmico prolongado, trayendo como consecuencia una mínima disminución del N%. Asimismo, se puede observar que las diferentes fracciones WPH (F3, F4 y F5) presentaron un contenido similar de proteínas, donde las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ). Esto indicaría que no existen diferencias en el contenido proteico de las fracciones mencionadas en relación al acondicionamiento de las mismas, por lo que la aplicación de ciertos tratamientos no afectó la calidad del hidrolizado. En la Figura 1 se pueden observar los cromatogramas resultantes del análisis del **perfil peptídico**. En cuanto al análisis cromatográfico de los hidrolizados se observó una muy buena cantidad de picos entre los 20 y los 40 min de corrida, con una desaparición casi completa de la albúmina sérica bovina (BSA, 53 min de corrida) y la  $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -LG, 56 min). Por otra parte, no se observaron picos fuertemente hidrofóbicos (tiempo > 40 min), lo cual es sumamente alentador, puesto que se ha asociado la liberación de grupos hidrófobos durante la hidrólisis de proteínas con el desarrollo del amargor. Además, los perfiles peptídicos de los extractos hidrolizados (F3, F4 y F5) resultaron ser muy similares (con cromatogramas prácticamente superpuestos, datos no mostrados), confirmando lo observado en el ensayo de determinación del contenido proteico. Finalmente, dada la similitud observada en el contenido proteico y perfil peptídico de las diferentes fracciones evaluadas, se decidió emplear sólo dos fracciones representativas del extracto sin hidrolizar (F2) y del hidrolizado (F5) para estudiar posteriormente la bioactividad de los mismos.



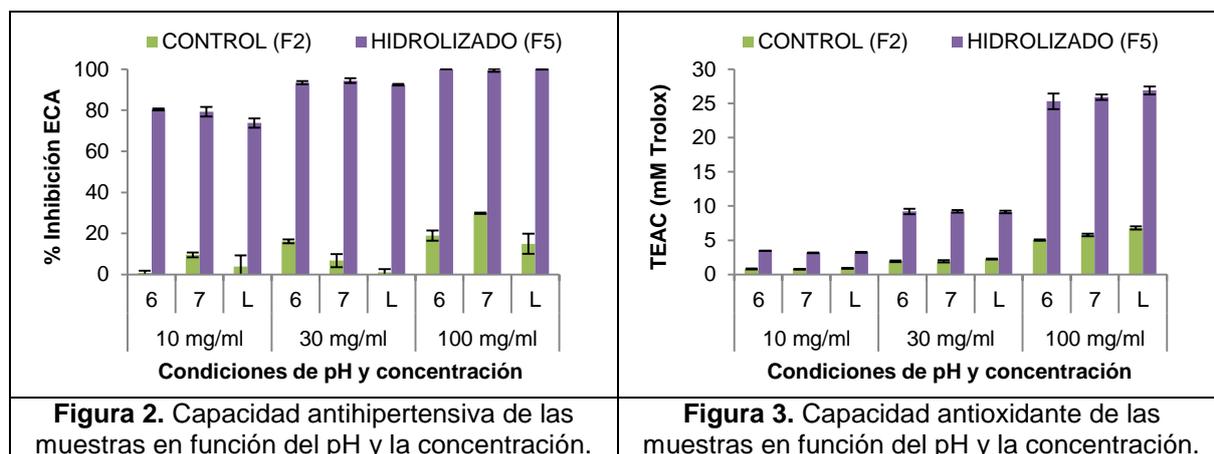
**Figura 1.** Cromatogramas correspondientes a los extractos de WPC (F2), WPH (F3) y a los reactivos estándares analizados ( $\beta$ -Lg y BSA).

La **actividad antimicrobiana** contra *Escherichia coli* DBFIQ Ec 9 (E.C), *Bacillus cereus* DBFIQ B 28 (B.C), *Listeria monocytogenes* LM 4 (L.M) y *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Sa 1 (S.A), se evaluó a 3 concentraciones de proteína (10-30-100 mg/ml), pH 6. Sólo se observó actividad inhibitoria a la máxima concentración ensayada (100 mg/ml) tanto en los extractos hidrolizados (F5) como en aquellos sin hidrolizar (F2) frente a todos los microorganismos excepto E.C. Si bien las muestras control exhibieron actividad inhibitoria, dichos valores evidenciaron ser mucho menores que las muestras de hidrolizados.

La **actividad antihipertensiva** se determinó a 3 niveles de pH (6, 7 y libre en agua) y a 3 concentraciones de proteína (10-30-100 mg/ml). El grado (%) de inhibición de la ECA observado para cada muestra se expresa en la Figura 2. Respecto al proceso de hidrólisis, se observó un fuerte efecto inhibitorio de los hidrolizados (F5), siendo mucho menor en los controles (F2). Por otro lado, la concentración tuvo una clara influencia en la inhibición observada, observándose en línea general que a mayor concentración, mayor es el efecto inhibitorio. En cuanto al pH, en las soluciones de WPH sólo tuvo influencia significativa en la menor concentración, resultando mayor a pH 6 y 7. En los extractos control, el efecto del pH fue diferente, no observándose una tendencia clara para las concentraciones ensayadas.

Finalmente, el estudio de la **actividad antioxidante** se realizó en las mismas condiciones utilizadas que el de actividad antihipertensiva, a través de la metodología de eliminación de radicales libres, y empleando Trolox (análogo de la Vitamina E) como antioxidante de

referencia. En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos expresados como TEAC (capacidad antioxidante equivalente al Trolox). Al igual que lo observado en el ensayo de actividad antihipertensiva, se obtuvo una fuerte actividad antioxidante en los hidrolizados (F5) en comparación con el control sin hidrolizar (F2). Asimismo, la concentración tuvo una marcada influencia de modo que cuando esta aumentaba, también lo hacía la actividad antioxidante. El pH únicamente tuvo una preponderancia estadística significativa a la mayor concentración analizada (100 mg/ml), siendo dicha actividad mayor a pH libre, seguido por las muestras a pH 7, y por último, el pH 6.



## CONCLUSIONES

En el presente estudio, los hidrolizados enzimáticos obtenidos evidenciaron interesantes capacidades antimicrobiana, antihipertensiva y antioxidante. Dicha bioactividad observada confirma el potencial de las proteínas del lactosuero como fuente de péptidos bioactivos, y la efectividad que presenta la hidrólisis enzimática para la liberación de los mismos en pos de su incorporación en formulados alimenticios.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Adler-Nissen J.**, 1986. Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. New York: Elsevier Applied Science Publishers.
- Cardoso MdM., Manzo RM., Tonarelli GG., Simonetta AC.**, 2012. Characterisation of a cell-free supernatant obtained from cultures of *Enterococcus faecalis* DBFIQ E24 with antagonistic activity against bacteria, yeasts and moulds. *International Journal of Dairy Technology*, 65 (4), 568-577.
- Cian RE., Luggren P., Drago SR.**, 2011. Effect of extrusion process on antioxidant and ACE inhibition properties from bovine haemoglobin concentrate hydrolysates incorporated into expanded maize products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62 (7), 774-780.
- De Castro RJS., Domingues MAF., Ohara A., Okuro PK., dos Santos JG., Brexó RP., Sato HH.**, 2017. Whey protein as a key component in food systems: Physicochemical properties, production technologies and applications. *Food Structure*, 14, 17-29.
- Fenoglio C., Vierling N., Manzo R., Ceruti R., Sihufe G., Mammarella E.**, 2016. Whey Protein Hydrolysis with Free and Immobilized Alcalase®: Effects of Operating Parameters on the Modulation of Peptide Profiles Obtained. *American Journal of Food Technology*, 11 (4), 152-158.
- Hernández Rojas M., Vélez Ruíz JF.**, 2014. Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8 (2), 13-22.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Yang M., Rice-Evans C.**, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26 (9-10), 1231-1237.
- Tagg JR., Mc Given AR.**, 1971. Assay systems for bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 21 (5), 943-947.