



Encuentro
de Jóvenes
Investigadores

ESTUDIO DEL IMPACTO DE LA MATRIZ ALIMENTARIA SOBRE LA BIOACTIVIDAD DE PÉPTIDOS OBTENIDOS A PARTIR DE HEZ DE MALTA

Pontoni, Sofia

Instituto de Tecnología de Alimentos, FIQ, UNL

Director: Cian, Raúl

Codirectora: Garzón, Antonela

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Péptidos bioactivos, Matriz alimentaria, Bioaccesibilidad.

INTRODUCCIÓN

En el proceso de elaboración de cerveza se genera un residuo constituido por sustancias insolubles denominadas en la industria “heza de malta” (HM). Este residuo representa un 85% de los subproductos generados en la industria cervecera. La HM posee un alto contenido de humedad (70-80%), resultando muy costoso para la industria llevar a cabo el secado. Por lo tanto, su aprovechamiento como residuo húmedo, adquiere un enorme interés para el sector agroindustrial. Una de las alternativas de uso es la obtención de péptidos bioactivos a partir de las proteínas presentes en la HM (Kotlar y col., 2013).

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas funciones biológicas tras su liberación mediante proteólisis. Dichos péptidos podrían utilizarse como aditivos en la elaboración de alimentos y bebidas funcionales dada la capacidad que poseen de regular procesos fisiológicos (Cian y col., 2015; Cermeño y col. 2019). Por otro lado, para poder ejercer su acción fisiológica, los péptidos bioactivos deben ser capaces de atravesar la barrera gastrointestinal y llegar a su sitio de acción. Sin embargo, uno de los factores que determina su absorción es el efecto matriz ejercido por los distintos componentes del alimento y/o suplemento dietario. Al respecto, el estudio de las interacciones péptido-ingrediente de la matriz alimentaria podría ayudar en la selección de matrices alimentarias eficaces que favorezcan la estabilidad de los péptidos bioactivos durante la digestión gastrointestinal, aumentando su bioaccesibilidad.

OBJETIVO

Estudiar el efecto de diferentes ingredientes alimentarios sobre la bioaccesibilidad *in vitro* de péptidos bioactivos obtenidos a partir de heza de malta.

Título del proyecto: Revalorización de subproductos de la industria cervecera. Extracción, propiedades tecno y biofuncionales y aplicaciones para la industria alimentaria de proteínas, carbohidratos no digeribles y compuestos fenólicos presentes en la heza de malta

Instrumento: PICT-2016-2879

Año convocatoria: 2017

Organismo financiador: FonCyT

Directora: Drago, Silvina R.

METODOLOGÍA

Se trabajó con “heza de malta” proporcionada por la Cervecería Santa Fe. El hidrolizado de HM (HHM) se obtuvo utilizando enzimas comerciales según Cian y col. (2018). Se determinó el grado de hidrólisis (GH) a través de la medición de aminos libres según Nielsen y col.



(2001). Con el fin de fraccionar y purificar los péptidos bioactivos obtenidos, se llevó a cabo un proceso escalonado de ultrafiltración (UF) del HHM usando membranas cuyo cut-off fue de 10, 5 y 1 kDa. Se obtuvieron 4 fracciones: F1 (>10 kDa), F2 (10-5 kDa), F3 (1-5 kDa) y F4 (<1 kDa). Tanto al HHM como a las fracciones obtenidas por UF se les determinó el contenido de sólidos, de proteínas mediante el método de Lowry, de aminos libres y de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu. Además, se determinó en cada una de las muestras la capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical ABTS (Cian y col., 2015), y la actividad antihipertensiva mediante la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina-I (ECA-I) (Cian y col., 2018). Para cada bioactividad, se determinó la concentración de proteínas que produce el 50% de inhibición (IC50). Adicionalmente, se le determinó el perfil de aminoácidos por HPLC a las muestras de HHM y a la fracción que resultó más bioactiva luego de la UF (F3).

Por último, se seleccionó la fracción de UF más bioactiva (F3) para estudiar el efecto de la goma xántica (GX) y pectina de bajo metoxilo (P) como ingredientes alimentarios utilizados comúnmente en la formulación de bebidas sobre la bioaccesibilidad *in vitro*. Para esto, se realizó un diseño experimental de superficie respuesta, central compuesto, con dos factores (Goma Xántica y Pectina) de tres niveles cada uno y triplicado del punto central, dando un total de 11 experimentos, seleccionando los niveles de acuerdo a lo usado comúnmente en la formulación de bebidas (GX: 0, 0,05, 0,1%; P: 0, 0,2, 0,4%). A cada matriz se le agregó además ácido cítrico y acesulfame de K al 0,2% cada uno, para simular una bebida ácida endulzada. A cada uno de los experimentos del diseño se les adicionó el mismo nivel de F3 (10 mg proteína), y las muestras fueron sometidas en una simulación de digestión gastrointestinal con pepsina y pancreatina utilizando un sistema con diálisis (Cian y col., 2015). A los dializados (fracción potencialmente bioaccesible) obtenidos con cada sistema se les determinó el contenido de proteínas y las actividades antihipertensivas y antioxidantes como se describió anteriormente. Además, se determinó la viscosidad a cada matriz a 37°C, a un gradiente de velocidad de 50 s⁻¹, utilizando un reómetro (Thermo Fisher, Haake MARS 40) con cilindros concéntricos. Para definir las condiciones óptimas de concentración y tipo de ingrediente alimentario que permita obtener la máxima bioaccesibilidad de compuestos bioactivos, se realizó la optimización minimizando los valores de IC50 de ABTS y ECA-I.

Se realizó el test de ANOVA para determinar diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$) y el test de Duncan para comparación de a pares al 95% de confianza, utilizando el Software Statgraphics Centurion XV.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

EL HHM presentó un GH de $13,9 \pm 0,5\%$. Este resultado fue consistente con lo obtenido previamente en un mismo hidrolizado por Cian y col. (2018).

Los resultados del contenido de proteínas, aminos libres y compuestos fenólicos por gramo de sólidos, tanto para el HHM como para F1-F4, se muestran en la **Figura 1**. Como se puede ver, en la F3 se concentró el contenido de proteínas, aminos libres y compuestos fenólicos. En este sentido, la fracción recolectada correspondiente a compuestos entre 1-5 kDa permitiría concentrar una mayor cantidad de compuestos bioactivos.

En la **Figura 2** se muestran los resultados de IC50 de la inhibición del ABTS y ECA-I, tanto del HHM como de las fracciones F1-F4. Se puede observar que tanto el HHM como cada una de las fracciones presentaron actividad antioxidante y antihipertensiva, probablemente debido a la presencia de péptidos y/o compuestos fenólicos en todas las fracciones. Por otro lado, las fracciones F1 y F3 presentaron el menor valor de IC50 para el ABTS, lo que indicaría que son las fracciones de mayor potencia antioxidante. En este sentido, en F1 se logran concentrar compuestos fenólicos condensados de alto peso molecular, los cuales

serían responsables de la elevada capacidad antioxidantes observada en dicha fracción. Por otro lado, la elevada actividad antioxidante observada en F3 podría estar asociada a un efecto combinado de péptidos y compuestos fenólicos. Además, F3 presentó la menor IC50 de ECA-I, indicando que dicha fracción presentó el mayor potencial antihipertensivo, concentrándose los compuestos inhibidores de ECA-I (menor IC50).

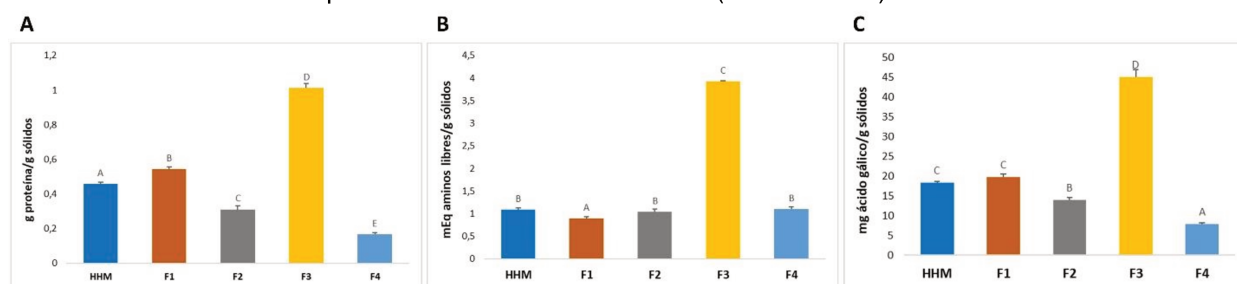


Figura 1. Contenido de proteínas (g proteínas/g sólidos) (A), aminoácidos libres (mEq aminoácidos libres/g sólidos) (B), y compuestos fenólicos (mg ácido gálico/g sólidos) (C) del hidrolizado (HHM) y las fracciones ultrafiltradas (F1-F4). Barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

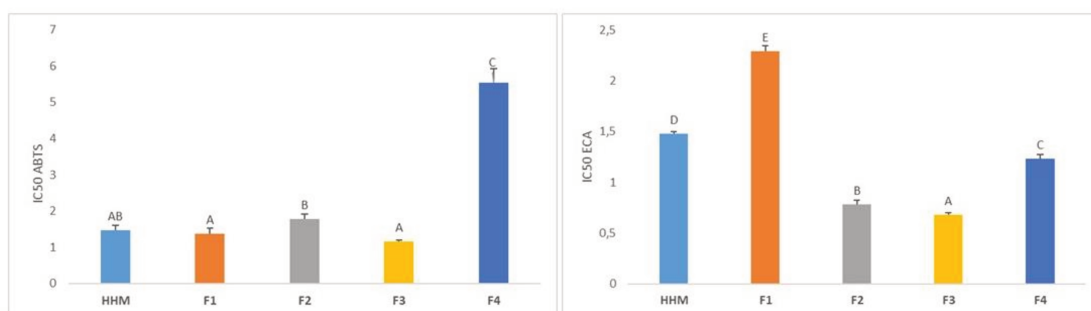


Figura 2. Concentración de proteínas (mg/mL) que inhibe el 50% (IC50) del radical ABTS (A) y de la enzima convertidora de angiotensina-I (ECA-I) (B) del hidrolizado (HHM) y las fracciones ultrafiltradas (F1-F4). Barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Si bien según la bibliografía el peso molecular de los péptidos antioxidantes más potentes está entre 400-650 Da (Zou y col., 2016), se han reportado péptidos de legumbres entre 1 y 3 kDa con alta actividad antioxidante (Ngoh y Gan, 2016). Adicionalmente, Connolly y col. (2015) estudiaron tres hidrolizados diferentes de la hez de malta, y encontraron en todos ellos, que la mayor inhibición de ECA-I fue en las fracciones entre 3-5 kDa. Por otra parte, se ha reportado que la hez de malta puede contener ácidos fenólicos libres (Bonifácio-Lopes y col., 2020), y la hidrólisis proteica podría favorecer su extracción. Además, los compuestos fenólicos son reconocidos por presentar un alto potencial antioxidante y a algunos de ellos se les ha asociado la inhibición de la ECA-I (Bonifácio-Lopes y col., 2020).

De acuerdo a los resultados obtenidos, F3 resultó ser la fracción con mejores propiedades bioactivas. Tanto a esta fracción como al HHM se le realizó un perfil de aminoácidos proteicos, y los resultados indicaron que para ambas muestras los aminoácidos mayoritarios fueron Glu, Ser y Leu. Además, el porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos fue del 44% para HHM, mientras que en F3 se incrementó a un 51%, indicando una mayor proporción de péptidos hidrofóbicos en esta fracción. En este sentido, la presencia de residuos hidrofóbicos es una característica clave en péptidos tanto antioxidantes como antihipertensivos (Sarmadi e Ismail, 2010; Lee y Hur, 2017).



Los resultados del diseño de experimentos mostraron que las tres respuestas evaluadas (IC50 de ABTS, de ECA-I, y viscosidad) ajustaron con un modelo cuadrático ($p < 0,05$, Lack of fit $> 0,05$). Además, la optimización del diseño mostró que valores intermedios de GX y P favorecieron el potencial antioxidante y antihipertensivo en los dializados, coincidiendo con valores intermedios de viscosidad. La solución obtenida que minimice los valores de IC50 de ambas bioactividades, presentó un valor de deseabilidad global de 0,93, y porcentajes de GX de 0,07% y P de 0,21%, con valores estimados de IC50 ABTS de 0,26 mg/mL, de IC50 de ECA-I de 0,67 mg/mL, y de viscosidad (γ 50 s⁻¹, 37°C) 8,17 mPa. Los valores del punto óptimo fueron verificados, y los resultados no difirieron significativamente con los estimados ($p > 0,05$). Los resultados obtenidos indicaron que la viscosidad de los ingredientes alimentarios resultó ser una propiedad clave para la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos. En este sentido, viscosidades altas y bajas disminuyeron el potencial bioactivo de los dializados, mientras que una viscosidad intermedia permitió probablemente una mejor liberación de los péptidos en el sitio de absorción, y una protección parcial contra la digestión gastrointestinal. Además, podrían producirse interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre la matriz alimentaria y los péptidos bioactivos, favoreciéndose así la bioaccesibilidad (Sun y Udenigwe, 2020).

En conclusión, la hez de malta podría ser usada en la obtención de péptidos bioactivos para formular bebidas con 0,07% de GX y 0,21% de pectina, agregando valor a un residuo obtenido en grandes cantidades.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Bonifácio-Lopes, T., Vilas Boas, A.A., Coscueta, E.R, y Pintado, M., 2020. Bioactive extracts from brewer's spent grain. *Food & Function*, 11: 8963-8977.

Cermeño M, Stack, J, Tobin P, y col., 2019. Peptide identification from a *Porphyra dioica* protein hydrolysate with antioxidant, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory activities. *Food and Function*.10(6).

Cian R, Garzón A, Betancur-Ancona D, y col., 2015. Hydrolyzates from *Pyropia columbina* seaweed have antiplatelet aggregation, antioxidant and ACE I inhibitory peptides which maintain bioactivity after simulated gastrointestinal digestion. *LWT - Food Science and Technology*. 64(2): 881-888.

Cian R, Garzón A, Matirnez-Agustin, O, y col., 2018. Antithrombotic Activity of Brewers' Spent Grain Peptides and their Effects on Blood Coagulation Pathways. *Plant Foods for Human Nutrition*. 73: 241–246.

Connolly, A., O'Keeffe, M.B., Piggott, C.O., Nongonierma, A.B. y FitzGerald, R.J., 2015. Generation and identification of ACE inhibitory peptides from a brewer's spent grain protein isolate. *Food Chemistry*, 176: 67-71.

Kotlar C, Ponce A, Roura S., 2013. Improvement of functional and antimicrobial properties of brewery byproduct hydrolysed enzymatically. *LWT - Food Science and Technology*. 50(2): 378-385.

Lee, S.Y. y Hur, S.J., 2017. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. *Food Chemistry*, 228: 506-517.

Ngoh, Y. y Gan C. 2016. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidant peptides from Pinto Beans. *Food Chemistry*, 190, 331-337.

Nielsen P, Petersen D, Dambmann C., 2001. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of food Science*. 66(5): 642-646.

Sarmadi, B.H. y Ismail, A., 2010. Antioxidant peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31: 1949-1956.

Sun, X. y Udenigwe, C.C., 2020. Chemistry and biofunctional significance of bioactive peptide interactions with food and gut components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68: 12972–12977.

Zou, T., He, T., Li, H., Tang, H. y Xia E, 2016. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*. 21: 72-86.

