

## EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA EN HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS DE PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO

Eberhardt Agustina

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

Área: Ingeniería  
Sub-Área: Alimentos  
Grupo: X

**Palabras clave:** Proteínas del lactosuero, Hidrólisis enzimática, Bioactividad.

### INTRODUCCIÓN

El suero es un abundante subproducto de la industria lechera, considerado el contaminante más importante de la misma, no sólo por su alta carga orgánica, sino también por su alto volumen. Sin embargo, su percepción como contaminante ha cambiado con el descubrimiento de propiedades funcionales y bioactivas (Brandelli y col., 2015). Las proteínas del suero de leche constituyen nutrientes con actividad funcional que contienen péptidos bioactivos, los cuales se vuelven activos cuando se liberan durante la digestión o la hidrólisis enzimática *in vitro* (Morais y col., 2014).

Diversos estudios han informado que los hidrolizados y los péptidos derivados de las proteínas de la leche exhiben actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), la cual es responsable del aumento de la presión sanguínea mediante la conversión de angiotensina I a angiotensina II (un agente vasoconstrictor fuerte), y de la degradación de la bradiquinina, que tiene acción vasodilatadora (Brandelli y col., 2015). Estas proteínas podrían ser introducidas en la dieta como un enfoque alternativo y no farmacológico para prevenir y tratar la hipertensión arterial (Morais y col., 2014).

En línea a lo mencionado, el uso de la tecnología enzimática constituye una estrategia interesante para convertir al lactosuero en productos con mayor valor agregado (Brandelli y col., 2015). Debido a que la actividad biológica de los péptidos está relacionada con la composición y secuencia de los aminoácidos que los conforman, las propiedades del hidrolizado dependerán del tipo de enzima empleado, del grado de hidrólisis, de las condiciones fisicoquímicas del proceso y del tratamiento previo del sustrato (Alvarado Carrasco y Guerra, 2010). En este sentido, el objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia de actividad antihipertensiva en hidrolizados de concentrado de proteínas de suero (WPC) obtenidos enzimáticamente por acción de una endopeptidasa de uso habitual en la industria alimenticia, considerando además la influencia de factores tales como el proceso de hidrólisis, el grado de hidrólisis alcanzado (DH), la concentración de los extractos y el pH del medio.

Proyecto: "Alternativas de elaboración de productos lácteos para mejorar su producción y sus características nutricionales".

Director del proyecto: Sihufe Guillermo A.

Director del becario/tesista: Sihufe Guillermo A.; Co-director: Manzo Ricardo M.

## METODOLOGÍA

### 1. Obtención de los hidrolizados enzimáticos

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 8 y 13%, asegurando minimizar los problemas de alergenidad asociados a las proteínas del lactosuero.

La reacción de hidrólisis se llevó a cabo utilizando el método del pH-stato (Fenoglio, 2013), 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 un pH cercano a 9 alcanzando una relación E/S (v/v) de 1/1200 y de 1/850 para DH 13% y 8%, respectivamente. El pH se mantuvo constante a lo largo de toda la reacción mediante la adición de NaOH 0,5 N, deteniéndose 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 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 la etapa final de inactivación térmica. Finalmente, tanto los hidrolizados como los blancos de reacción fueron liofilizados.

### 2. Estudio de la actividad antihipertensiva

Para determinar la actividad antihipertensiva, se evaluó la presencia de actividad inhibitoria sobre la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), empleando el método espectrofotométrico descrito por Cian y col. (2011). El mismo se fundamenta en la reacción colorimétrica específica entre el ácido hipúrico liberado por la ECA y la 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (TT), que genera un compuesto coloreado cuya absorbancia se lee espectrofotométricamente a 382 nm.

#### 2.1. Extracción de la ECA

La enzima se extrajo a partir de pulmones de conejo. Para ello, se homogeneizó en frío (utilizando un baño de hielo molido) 1 g de pulmón con 5 ml de buffer fosfato 100 mM (pH 8,3) con el agregado de D-sacarosa a una concentración final de 250 mM, mezcla a la que se le agregaron 5 µl de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100mM. Posteriormente, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4°C y el sobrenadante resultante se utilizó como fuente de ECA.

#### 2.2. Ensayo de inhibición de la ECA

Las muestras a evaluar fueron los extractos de hidrolizado DH 8% y 13% y los respectivos controles (WPC sin hidrolizar), suspendidos a distintas concentraciones (10, 30 y 100 mg/ml) y a tres valores de pH: 6 y 7 (utilizando buffer fosfato 50 mM) y a pH libre (cercano a 10) por disolución en agua desionizada.

Cada mezcla de reacción se preparó en un tubo de microcentrífuga de 2 ml enfriado en un baño de hielo molido. Seguidamente, cada preparación se incubó en un baño de agua a 37°C durante 45 min. La reacción se detuvo por la adición de 665 µl de TT en dioxano (30 mg/ml) y 1,1 ml de buffer fosfato 100 mM (pH 8,3). Luego de 10 min de

espera para dar tiempo a la formación de color, se centrifugó a 12000 rpm por 10 min y a temperatura ambiente. A continuación, se procedió a leer la absorbancia de cada mezcla de reacción a 382 nm. La actividad de la ECA se calculó a partir de la **Ecuación 1**:

$$\text{Actividad de ECA} = \frac{(AM-ABM)}{(AES-ABES)} * 100 \quad (1)$$

Donde AM: absorbancia de la muestra (muestra + enzima + sustrato); ABM: absorbancia del blanco de la muestra (muestra + enzima); AES: absorbancia de la enzima + el sustrato; BES: absorbancia del blanco de la enzima + el sustrato.

Finalmente, el porcentaje de inhibición de cada muestra se obtuvo a partir de la **Ecuación 2**:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \text{Actividad ECA} \quad (2)$$

### 3. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se usó ANOVA, de manera tal de evaluar la influencia de los factores hidrólisis, DH, concentración de los extractos y pH del medio sobre el grado de inhibición de la ECA observado. Cuando el efecto de los factores fue significativo ( $P < 0.05$ ), se realizó una comparación de medias por el método LSD. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Statgraphics (Statgraphics Inc., Rockville, MD, Estados Unidos).

## RESULTADOS

En la **Tabla 1** se observa el grado de inhibición promedio de la ECA y su desviación estándar observado para cada una de las muestras y condiciones estudiadas.

**Tabla 1.** Inhibición (%) de la ECA observada para las distintas condiciones estudiadas.  
<sup>a-j</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Muestra	Concentración (mg/ml)	pH	Inhibición (%)	
			DH 8%	DH 13%
Control	10	6	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,76 ± 1,08 <sup>a</sup>
	30	6	14,83±1,50 <sup>d</sup>	16,15 ± 0,89 <sup>d</sup>
	100	6	40,60±5,81 <sup>f</sup>	18,89 ± 2,49 <sup>d</sup>
	10	7	4,75±4,74 <sup>ab</sup>	9,56 ± 1,19 <sup>c</sup>
	30	7	8,12±3,01 <sup>bc</sup>	6,72 ± 3,21 <sup>bc</sup>
	100	7	29,49±1,30 <sup>e</sup>	29,81 ± 0,31 <sup>e</sup>
	10	Libre	0,00±0,00 <sup>a</sup>	3,83 ± 5,41 <sup>ab</sup>
	30	Libre	0,00±0,00 <sup>a</sup>	1,06 ± 1,50 <sup>a</sup>
	100	Libre	26,91±0,80 <sup>e</sup>	14,95 ± 4,88 <sup>d</sup>
Hidrolizado	10	6	81,48±6,13 <sup>h</sup>	80,44 ± 0,46 <sup>h</sup>
	30	6	95,61±1,38 <sup>ij</sup>	93,39 ± 0,78 <sup>i</sup>
	100	6	99,51±0,69 <sup>j</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>j</sup>
	10	7	73,94±1,28 <sup>g</sup>	79,25 ± 2,32 <sup>h</sup>
	30	7	96,56±0,00 <sup>ij</sup>	94,46 ± 1,21 <sup>i</sup>
	100	7	99,31±0,98 <sup>j</sup>	99,49 ± 0,72 <sup>j</sup>
	10	Libre	71,06±0,60 <sup>g</sup>	73,77 ± 2,31 <sup>g</sup>
	30	Libre	95,87±0,38 <sup>ij</sup>	92,44 ± 0,36 <sup>i</sup>
	100	Libre	99,55±0,63 <sup>j</sup>	99,93 ± 0,10 <sup>j</sup>

En relación al análisis estadístico, se observó que el porcentaje de inhibición resultó significativamente afectado por el DH (A), el proceso de hidrólisis (B), la concentración (C) y el pH (D). Al estudiar la interacción entre los 4 factores evaluados, se observó que no existieron diferencias significativas sólo en los casos C-D y A-B-D.

Respecto al proceso de hidrólisis, se apreció un fuerte efecto inhibitorio de los hidrolizados, en un rango que oscila entre 71-100%. Por otro lado, las muestras sin hidrolizar presentaron un efecto mucho menor (entre 0-10% y 0-17% a las concentraciones de 10 y 30 mg/ml, respectivamente), llegando hasta un máximo del 40% de inhibición a 100 mg/ml, a pH 6 y DH 8% (**Tabla 1**).

En general, se observó que el porcentaje de inhibición de la ECA no presentó diferencias frente a los DH evaluados, siendo sólo posible ver variaciones considerables en las muestras control a la máxima concentración a pH 6 y pH libre, resultando también el mayor porcentaje de inhibición observado al DH de 8%.

Por otro lado, la concentración de los extractos resultó tener una clara influencia en la inhibición observada, ya que, tanto en el WPC como en los hidrolizados se evidenció que a mayor concentración, mayor es el efecto inhibitorio determinado. En líneas generales, las mayores discrepancias se observaron entre los grados de inhibición de los extractos de 10 mg/ml en comparación con los correspondientes a los extractos de 30 y 100 mg/ml.

Finalmente, el efecto del pH en las soluciones de hidrolizados sólo tuvo una influencia significativa para la menor concentración (10 mg/ml), apreciándose a pH 6 y 7 un mayor efecto inhibitorio que el observado para los hidrolizados testeados a pH libre. En los extractos control de WPC, el efecto del pH fue diferente, no observándose una tendencia clara para las concentraciones de trabajo y DH estudiados.

## CONCLUSIONES

El proceso de hidrólisis de las proteínas del suero lácteo presentes en el WPC 80 utilizando la preparación enzimática Alcalasa frente a las condiciones ensayadas arrojó muy buenos resultados en relación a la funcionalidad biológica lograda. Los hidrolizados proteicos obtenidos evidenciaron capacidades de inhibición de la actividad de la ECA, confirmando el potencial bioactivo de las proteínas contenidas en el lactosuero. De esta forma, la presencia de péptidos con capacidad de disminuir la presión arterial en los hidrolizados de proteínas de suero lácteo, abre a la posibilidad de que los mismos sean utilizados con fines nutracéuticos o en preparaciones alimenticias comerciales.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Alvarado Carrasco CE, Guerra M**, 2010. Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 23(1), 42-49.
- Brandelli A, Daroit D.J, Corrêa APF**, 2015. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International*, 73, 149-161.
- 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.
- 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.
- Morais HA, Silvestre MP, Amorin LL, Silva VD, Silva MR, Simões e Silva AC, Silveira JN**, 2014. Use of Different Proteases to Obtain Whey Protein Concentrate Hydrolysates with Inhibitory Activity toward Angiotensin-Converting Enzyme. *Journal of Food Biochemistry*, 38(1), 102-109.