

BIOACTIVIDAD DE PÉPTIDOS DE FRACCIONES ULTRAFILTRADAS DE HIDROLIZADOS PROTEICOS OBTENIDOS DEL ALGA *Pyropia columbina*

Antonela G. Garzón

*Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química - Universidad Nacional del Litoral, 1º
de Mayo 3250, (3000) Santa Fe, Argentina
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.*

Área: Ingeniería
Sub-Área: Alimentos

INTRODUCCIÓN

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora (“encriptados”), que ejercen determinadas funciones biológicas tras su liberación mediante proteólisis. Generalmente, son péptidos de pequeño tamaño (3 a 20 aminoácidos), que son liberados durante la digestión gastrointestinal o procesamiento de los alimentos. A partir de las proteínas de las algas rojas se han obtenido hidrolizados enzimáticos con diferentes propiedades bioactivas (antioxidantes, antihipertensivas, antimicrobianas, anticoagulantes, entre otras), y en algunos casos, se han logrado aislar e identificar los péptidos responsables de dicha bioactividad (Harnedy y Fitzgerald, 2011).

Una alternativa para fraccionar péptidos con un determinado tamaño molecular y bioactividad, a bajo costo y de forma eficiente es el proceso de *ultrafiltración* (Kim y Wijesekara, 2010). Las membranas empleadas para la *ultrafiltración* constituyen una barrera física que retiene todos los compuestos con mayor peso molecular que el corte del filtro (retenido, R), y deja pasar los de menor tamaño (permeado, P).

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo fue concentrar péptidos con bioactividad mediante la ultrafiltración de hidrolizados con propiedades antioxidantes e inhibidoras de ECA I (antihipertensivos) obtenidos con distintos sistemas enzimáticos a partir de un extracto proteico del alga roja *Pyropia columbina*.

METODOLOGÍA

Obtención de los hidrolizados y las fracciones ultrafiltradas

A partir de un extracto proteico (EP) del alga roja *Pyropia columbina* se prepararon dos hidrolizados: A: hidrólisis con Alcalasa 2 h; AF: hidrólisis con Alcalasa 2 h + Flavourzyme 4 h. La temperatura de hidrólisis en ambos sistemas fue 55°C. Los hidrolizados fueron centrifugados a 2000xg durante 15 min a 25°C. Una alícuota de EP fue centrifugada conjuntamente con los hidrolizados y el sobrenadante obtenido (material soluble de partida sin hidrolizar) fue considerado como un blanco (B) del proceso de hidrólisis.

La ultrafiltración de B, A y AF se llevó a cabo con un equipo de ultrafiltración Molecular/Por® Stirred Cell S-43-70. Para tal fin, se utilizó una membrana Molecular/Por® Cellulose Ester, cuyo corte fue 10 kDa. Se obtuvo para cada muestra

un permeado (P) y un retenido (R), denominados PB y RB para B, PA y RA para A, y PAF y RAF para AF.

Caracterización de las muestras

Las muestras fueron evaluadas en cuanto a: contenido de compuestos fenólicos extractables en agua (CFE) (Schanderl, 1970) y contenido de aminos libres (Nielsen y col., 2001).

Evaluación de propiedades antioxidantes y antihipertensivas de las fracciones ultrafiltradas (P y R)

Las propiedades antioxidantes de las fracciones resultantes de la ultrafiltración se evaluaron mediante los siguientes métodos: 1) capacidad antioxidante frente al radical ABTS (Cian y col., 2012); los resultados se expresaron como el contenido de proteínas que inhibe el 50% del radical (IC₅₀); 2) capacidad antioxidante frente al radical DPPH (Brand-Williams y col., 1995) expresada como IC₅₀; 3) capacidad quelante ligada al cobre frente a la oxidación del β-caroteno (CQ) (Megias y col., 2008). La CQ se calculó a los 180 min de reacción, en función de los controles positivo y negativo. El resultado se expresó en mg EDTA g⁻¹ proteína. 4) Capacidad antioxidante por el método del ácido linoleico (CAAL), utilizando el ensayo de blanqueamiento del β-caroteno (Pedroche y col., 2007). Las muestras fueron evaluadas a una concentración proteica de 2 g L⁻¹ y la CAAL expresada como porcentaje de degradación del β-caroteno a los 60 min de reacción. 5) Poder reductor (PR) de acuerdo a Oyaizu (1986), expresado como μg de ácido ascórbico (AA) equivalente g⁻¹ proteína.

Las propiedades antihipertensivas fueron evaluadas mediante el ensayo de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA I) de acuerdo a Hayakari y col. (1978), y se determinó para cada muestra la concentración proteica que produce una inhibición del 50% de la enzima ECA I (IC₅₀).

RESULTADOS

Caracterización de las muestras B, A y AF y sus fracciones ultrafiltradas

El contenido de aminos libres de PA y PAF fue significativamente superior al de PB (2,9 y 3,5 vs 2,4 mEq L-ser g⁻¹ sólido). El valor más alto se encontró en PAF, lo que estaría asociado con la acción exopeptidasa de la enzima Flavourzyme.

En cuanto al contenido de compuestos fenólicos, los hidrolizados presentaron mayor contenido de CFE que B (20,0 vs 14,3 mg equivalente de ácido gálico g⁻¹ sólido), lo que puede deberse a que la hidrólisis de las proteínas se acompaña de liberación de compuestos fenólicos, favoreciéndose su solubilización y extracción. Además, se observó una mayor concentración de CFE en los permeados de los hidrolizados que en PB (35,0 vs. 29,0 mg equivalente de ácido gálico g⁻¹ sólido). Esto indicaría que los CFE logran dializar a través de la membrana de 10 kDa, luego de ser liberados por las proteasas.

Evaluación de propiedades antioxidantes y antihipertensivas de las fracciones ultrafiltradas (P y R)

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de la actividad antioxidante evaluada utilizando diferentes técnicas.

Tabla 1. Actividad antioxidante de las fracciones ultrafiltradas: inhibición de ABTS, inhibición de DPPH, capacidad quelante (CQ), capacidad antioxidante por el método del ácido linoleico (CAAL) y poder reductor (PR).

Muestra	IC50 ABTS (g/L)	IC50 DPPH (g/L)	CQ (mg EDTA g ⁻¹ proteína)	CAAL (%)	PR (ug AA g ⁻¹ proteína)
PB	1,3 ± 0,1 ^d	1,88 ± 0,09 ^e	35,64 ± 3,93 ^d	13,59 ± 2,09 ^a	9,83 ± 0,10 ^b
RB	4,7 ± 0,3 ^e	3,71 ± 0,30 ^f	15,85 ± 1,23 ^a	46,99 ± 0,75 ^b	5,02 ± 0,45 ^a
PA	0,36 ± 0,00 ^b	1,73 ± 0,06 ^b	58,71 ± 3,71 ^e	64,71 ± 1,92 ^d	53,99 ± 1,39 ^f
RA	0,88 ± 0,00 ^c	1,12 ± 0,08 ^c	27,30 ± 2,22 ^c	63,98 ± 4,50 ^{cd}	41,62 ± 1,84 ^e
PAF	0,27 ± 0,00 ^a	0,50 ± 0,05 ^a	76,90 ± 4,68 ^f	43,11 ± 2,39 ^b	23,69 ± 0,81 ^d
RAF	0,77 ± 0,02 ^c	2,08 ± 0,10 ^d	21,18 ± 3,00 ^b	62,43 ± 3,29 ^{cd}	17,57 ± 0,48 ^c

X ± DE. En cada columna, valores con distintas letras indican diferencias significativas entre las muestras (p<0,05). P: permeado; R: retenido; B: blanco; A y AF: hidrolizados

Para todos los métodos evaluados, la actividad antioxidante (AAO) fue mayor en los permeados de los hidrolizados (PA y PAF) que en el permeado del blanco sin hidrolizar (PB), y en los retenidos de los hidrolizados (RA y RAF) que en el retenido del blanco sin hidrolizar (RB). Esto podría estar asociado a la liberación de péptidos antioxidantes durante el proceso de hidrólisis y al mayor contenido de CFE de los hidrolizados. Además, respecto a las fracciones ultrafiltradas, la AAO fue mayor en el permeado, con lo cual es posible separar y concentrar en dicha fracción péptidos bioactivos y CFE con capacidad antioxidante, de forma eficiente y a bajo costo.

En la Figura 1 se muestra la concentración de proteína que inhibe el 50% de la ECA I (IC50).

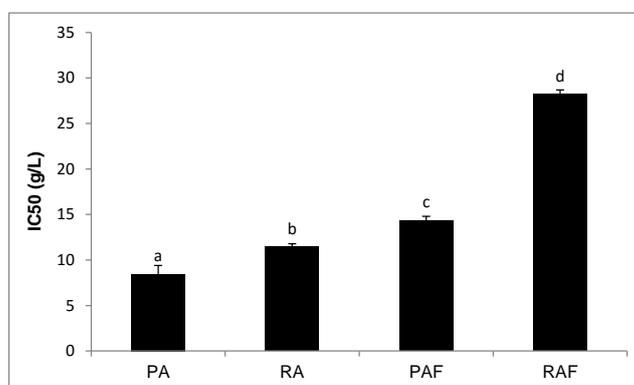


Figura 1. Concentración de proteína que inhibe el 50% de la enzima ECA I (IC50) de las fracciones ultrafiltradas (R y P) de los hidrolizados A y AF (g L⁻¹). Barras con distintas letras indican diferencias significativas entre las muestras (p<0,05).

El valor de IC50 obtenido para PA fue superior al de PAF. Esto indica que los péptidos de tamaño intermedio presentes en PA son inhibidores más potentes que los de bajo peso molecular y aminoácidos libres obtenidos con el sistema enzimático AF.

Al igual que para la AAO, fue posible observar una mayor inhibición de ECA en los permeados que en los retenidos, indicando que el proceso de ultrafiltración es efectivo para separar péptidos bioactivos y CFE con actividad antihipertensiva.

CONCLUSIONES

Las fracciones permeadas de hidrolizados de *P. columbina* se podrían emplear como agentes antioxidantes para la preservación de alimentos. Además, se podrían utilizar en la industria farmacéutica como anti-hipertensivos si se corrobora su acción *in vivo*. El proceso de ultrafiltración resultó ser una muy buena estrategia para concentrar ciertas propiedades antioxidantes y antihipertensivas a bajo costo.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. y Berset, C**, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol*. 28: 25-30.
- Cian, R.E, Martínez-Augustin, O. y Drago, S.R**, 2012. Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. *Food Res Int*. 49:365-372.
- Harnedy, P.A. y FitzGerald, R.J**, 2011. Bioactive proteins, peptides, and amino acids from macroalgae. *J. Phycol*. 47: 218-232.
- Hayakari, M., Kondo, Y. y Izumi, H.** 1978. A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Anal Biochem*. 84, 361-369.
- Kim, S-K. y Wijesekara, I**, 2010 Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *J funct foods*. 2.
- Megias, C., Pedroche, J., Yust, M.M., Girón-Calle, J. Alaiz, M. Millán, F. y Vioque, J.**, 2008. Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT- Food Sci Technol*. 41: 1973-1977.
- Nielsen, P.M., Petersen, D. y Dambann C**, 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Food Chem Toxicol*. 66(5):642-646.
- Oyaizu, M.** 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jap J Nutr* 44: 307-315.
- Pedroche, J., Yust, M.M., Lqari, H., Megias, C., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J. y Millán, F.** 2007. Obtaining of *Brassica carinata* protein hydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases. *Food Res Int*. 40: 931-938.
- Schanderl, S**, 1970. Tannins and related phenolics. In: Joslyn MA (ed) *Methods in food: analysis physical, chemical and instrumental methods of analysis* New York: Academic. p. 701- 725.