



PROPIEDADES HIPOLIPEMIANTES DE PÉPTIDOS OBTENIDOS A PARTIR DE HEZ DE MALTA

AQUINO, Marilyn¹

¹*Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, UNL
Director/a: Dr. Raúl, Cian
Codirector/a: Lic. Garzón, Antonela*

Área: Ciencias Biológicas

Palabras clave: Hez de malta; Péptidos bioactivos; Intercambio iónico.

INTRODUCCIÓN

La hipercolesterolemia y la hiperglicemia son desórdenes metabólicos caracterizados por altos niveles de colesterol y triglicéridos en sangre, que incrementan los riesgos de contraer enfermedades cardiovasculares (Banan-Mwine Daliri y col. 2017). Aunque existen medicamentos que tienen como objetivo disminuir el colesterol en sangre, algunos alimentos funcionales y compuestos bioactivos naturales podrían tener un rol preventivo (Aiello y col. 2018).

Actualmente existe un interés creciente en buscar fuentes no convencionales de compuestos bioactivos, que agreguen valor a los subproductos industriales. La hez de malta (HM) es el subproducto más abundante generado en el proceso de elaboración de cerveza. La fibra constituye aproximadamente la mitad de la composición en peso seco, mientras que las proteínas pueden constituir hasta un 30%. Además de su importancia como fuente de ingredientes alimentarios, la HM puede ser una fuente potencial de componentes bioactivos que promueven la salud (Lynch y col. 2016). Estudios recientes han demostrado que la ingesta de hidrolizados proteicos y péptidos de origen vegetal pueden reducir la concentración de colesterol en sangre (Ruiz Ruiz y col. 2014). Los péptidos identificados como hipolipemiantes pueden actuar reduciendo la solubilidad del colesterol en las micelas lipídicas (Banan-Mwine Daliri y col. 2017), y/o inhibiendo las enzimas lipasa y colesterol esterasa del tracto gastrointestinal (Prados y col., 2018).

Los componentes bioactivos presentes en hidrolizados y concentrados proteicos se pueden obtener mediante diferentes métodos. Un enfoque clásico para producir péptidos bioactivos es encontrar una fuente de proteína adecuada, seguido de su hidrólisis enzimática, a fin de generar péptidos con una bioactividad potencial. Luego se procede a la identificación de las secuencias de péptidos y finalmente a la confirmación de la bioactividad (Chakrabarti y col. 2018). Es bien sabido que la cromatografía es la técnica más poderosa para aislar y purificar péptidos bioactivos. Diferentes sistemas cromatográficos han sido desarrollados sobre la base de las propiedades de las moléculas (Lemes y col. 2016), con lo que es posible separar y purificar péptidos bioactivos en base a sus propiedades fisicoquímicas.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar las propiedades hipolipemiantes *in vitro* de péptidos obtenidos a partir de hez de malta y caracterizar las fracciones peptídicas por cromatografía de intercambio iónico.



Federación
Universitaria
del Litoral

100



UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL LITORAL

Título del proyecto: Obtención de péptidos bioactivos a partir del subproducto cervecero “hez de malta”. Encapsulación con matrices biopoliméricas como vehículo protector.

Instrumento: PICT 2716

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: FONCYT

Director/a: Raúl Esteban Cian

METODOLOGÍA

Se trabajó con “hez de malta” (HM) proporcionada por la Cervecería Santa Fe (Cervecería Santa Fe – Compañías Cerveceras Unidas o CCU, Calchines 1401 – Santa Fe (3000), Argentina). Los péptidos de HM fueron obtenidos mediante un esquema de hidrólisis secuencial, empleando el siguiente sistema: neutrasa (endoproteasa) durante 2 horas y luego se adicionó la enzima Flavourzyme (exoproteasa) dejándola actuar durante 2 horas más (tiempo total de reacción: 4 horas). Se determinó el grado de hidrólisis a través de la medición de aminos libres utilizando la técnica del o-ftaldialdehído (OPA), según Nielsen y col. (2001).

Los péptidos obtenidos fueron fraccionados por cromatografía de intercambio iónico, utilizando una columna aniónica (resina AG – X4 (100 – 200 mesh) – Biorad®). Para la elución de los péptidos se utilizó un gradiente lineal de NaCl (0; 0,2; 0,4 y 0,6 mol/L), obteniéndose cuatro fracciones: F0, F2, F4 y F6, respectivamente. A cada fracción se le determinó el contenido de proteínas según Lowry y col. (1951). Las propiedades hipolipemiantes *in vitro* de las fracciones se evaluaron mediante la reducción de la incorporación del colesterol a las micelas y la inhibición de las enzimas colesterol esterasa (CE) y lipasa pancreática, según Prados y col. (2018). Las fracciones que exhibieron mayor actividad fueron caracterizadas de acuerdo a su composición aminoacídica (HPLC) y tamaño molecular (FPLC).

Todas las muestras se evaluaron por triplicado. Se realizó el test de ANOVA para determinar diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$) y el test de LSD (*Least Significant Difference*) para comparación de a pares al 95% de confianza, utilizando el Software Statgraphics Centurion XV.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

El hidrolizado obtenido presentó un grado de hidrólisis de $14,3 \pm 0,1\%$. En la **Tabla 1** se muestran los resultados de la actividad hipolipemiente de las fracciones eluidas en la cromatografía de intercambio iónico, evaluadas a una misma concentración proteica (4 mg/mL).

Los péptidos de HM presentaron propiedades hipolipemiantes.

Tabla 1. Actividad hipolipemiente de las fracciones estudiadas F0, F2, F4 y F6.

Muestra	Inhibición de incorporación de colesterol a la Micela (%)	Inhibición de CE (%)	Inhibición de lipasa (%)
F0	$87,7 \pm 0,8^a$	$46,5 \pm 3,4^c$	$15,29 \pm 0,04^a$
F2	$87,7 \pm 0,8^a$	$26,6 \pm 4,0^b$	$26,7 \pm 0,7^b$
F4	$92,2 \pm 0,8^b$	$11,9 \pm 1,2^a$	$41,8 \pm 2,3^d$
F6	$89,4 \pm 1,6^{ab}$	$14,6 \pm 0,8^a$	$31,5 \pm 1,0^c$

CE: colesterol esterasa. Valores con diferentes letras en una misma fila presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se puede observar que la fracción que presentó mayor inhibición de la enzima CE fue F0. Esta fracción no interactuó con la columna, por lo que tendría una mayor proporción de aminoácidos

básicos cargados positivamente. Por otra parte, la fracción F4 fue la que exhibió mayor capacidad para reducir la incorporación del colesterol a las micelas e inhibir a la enzima lipasa pancreática. En las **Figuras 1 y 2** se muestran los resultados obtenidos del tamaño molecular por FPLC y del perfil de aminoácidos por HPLC, respectivamente, para las fracciones eluidas que presentaron mayor actividad.

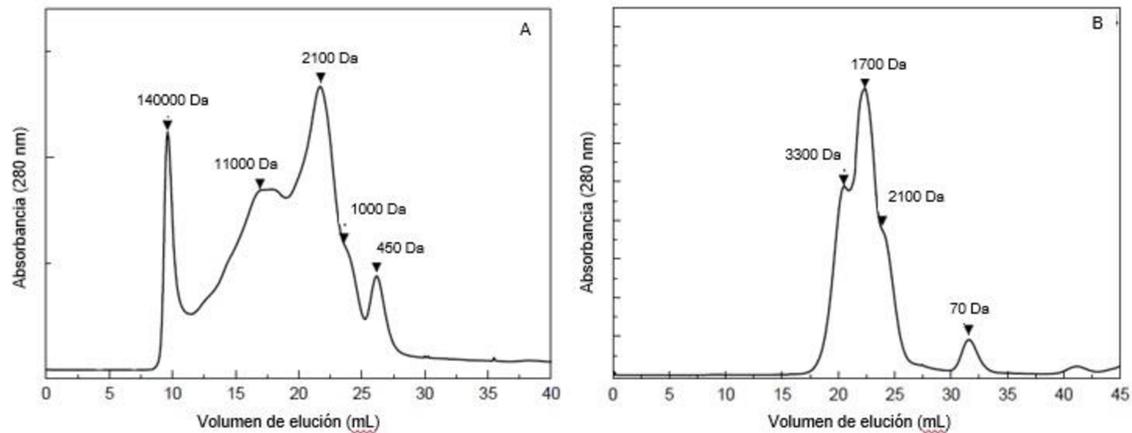


Figura 1. Perfiles cromatográficos para las fracciones eluidas. El perfil A corresponde a la muestra F0 y el perfil B corresponde a la muestra F4. En ambos casos se muestran los tamaños moleculares (Da) de los picos más representativos.

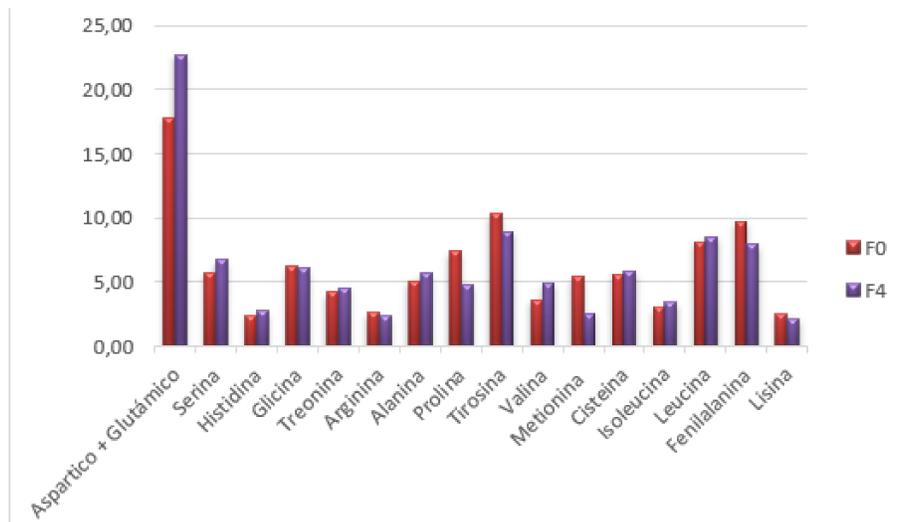


Figura 2. Perfil de aminoácidos (g/100 g proteína) de las fracciones F0 y F4.

Se puede ver que la fracción F0 que inhibió la enzima CE presentó una elevada proporción de péptidos de 2100 Da (40 % del área total), aminoácidos hidrofóbicos y básicos (58 y 15%, respectivamente).

Por otra parte, F4 presentó un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos y ácidos (54 y 11%, respectivamente), y además, una elevada proporción de péptidos de 1700 Da (37 % del área total). Si se tiene en cuenta que el tamaño medio de un aminoácido es 120 Da, ambas fracciones presentarían un elevado contenido de oligopéptidos (≈ 16 aminoácidos).

Los péptidos de HM podrían ejercer actividad hipolipemiante a través de la inhibición de la digestión lipídica, mediante la reducción de la incorporación del colesterol a las micelas y la inhibición de las enzimas colesterol esterasa y lipasa pancreática. Este efecto podría deberse a la presencia de oligopéptidos con elevada proporción de aminoácidos hidrofóbicos y, en menor medida, aminoácidos cargados.

Megías y col. (2009) reportaron que la inhibición de la solubilidad micelar del colesterol aumentaba al aumentar la hidrofobicidad y que los péptidos inhibidores presentaban mayores cantidades de Ala, Tyr, Val, Leu o Lys. Posiblemente la mayor hidrofobicidad favorece la inmersión de estos péptidos en las micelas lipídicas. Por otra parte, Prados y col. (2018) estudiaron la actividad hipolipemiante de hidrolizados proteicos de olivos, fraccionados por ultrafiltración, y encontraron que los péptidos de mayor tamaño inhibían en mayor medida la adición del colesterol en micelas y la enzima colesterol esterasa, y que los residuos de aminoácidos ácidos podrían ser importantes para ejercer estas actividades.

Debido a que la inhibición de las enzimas lipasa pancreática y colesterol esterasa por parte de péptidos bioactivos está comenzando a estudiarse en el mundo científico, hasta la fecha los estudios publicados no son suficientes para comparar oligopéptidos con actividades inhibitorias de lipasa pancreática y colesterol esterasa en relación al tamaño y la carga, con los obtenidos en éste trabajo de investigación mediante cromatografía de intercambio iónico, FLPC y HLPC. Los resultados obtenidos en este trabajo son los primeros en encontrar péptidos hipolipemiantes a partir de HM. Más estudios deben realizarse para determinar la secuencia del péptido que ejerce cada actividad.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Aielloa G.; Ferruzab, S.; Ranaldib, G.; Sambuyb, Y.; Arnoldia, A.; Vistolia, G. y Lammia, C., 2018. Behavior of three hypocholesterolemic peptides from soy protein in an intestinal model based on differentiated Caco-2 cell. *Journal of Functional Foods* 45: 363–370

Banan-Mwine Daliri, E.; Oh, D.; y Lee, B., 26 de abril de 2017. *Bioactive Peptides*. MDPI. Foods

Chakrabarti, S.; Guha, S. y Majumder K., 12 de noviembre de 2018. *Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health: Challenges and Opportunities*. MDPI. Nutrients.

Connolly, A.; O’Keeffe, M.; Nongonierma, A.; Piggott C. y FitzGerald, R., 2017. Isolation of peptides from a novel brewers spent grain protein isolate with potential to modulate glycaemic response. *International Journal of Food Science and Technology*: 52, 146–153

Lemes, A.; Sala, L.; Costa Ores, J.; Cavalcante Braga, A.; Buranelo Egea, M. y Fernandes, K., 16 de junio de 2016. A Review of the Latest Advances in Encrypted Bioactive Peptides from Protein-Rich Waste. MDPI. *International Journal of Molecular Sciences*.

Lowry, H.; Rosebrough, N.; Farr, A. y Randall R., 28 de mayo de 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Department of Pharmacology, Washington University School of Medicine, St Luis, Missouri.

Lynch, K.; Steffen, J. y Arendt, E., 17 de julio de 2016. Brewers’ spent grain: a review with an emphasis on food and health. Institute of Brewing & Distilling. [wileyonlinelibrary.com: DOI 10.1002/jib.363](https://doi.org/10.1002/jib.363)

Megías, C.; Pedroche, J.; Yust, M.; Alaiz, M.; Girón-Calle, J.; Millán y Vioque, J., 2009. Sunflower Protein Hydrolysates Reduce Cholesterol Micellar Solubility. *Plant Foods Hum Nutr.* 64:86–93

Nielsen, P.; Petersen, D. y Dambmann, C., 2001. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *JFS: Food Chemistry and Toxicology*.

Prados, I.; Marina, M. y García, M., 2018. Isolation and identification by high resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry of novel peptides with multifunctional lipid lowering capacity. *Food Research International* 111: 77–86

Ruiz Ruiz, C; Betancur Ancona, D. y Segura Campos, M., 2014. Bioactive vegetable proteins and peptides in lipid-lowering; nutraceutical potential. *Nutrición Hospitalaria*: 29(4):776-784.