

OBTENCION DE ANTIOXIDANTES NATURALES MEDIANTE HIDROLISIS ENZIMATICA DE PLASMA BOVINO

Simonetti Germán (1), Toyé Laura (2), Legisa, Danilo (2), Catone, Mariela (2), Amedei, Hugo (2),

Matos, María Laura (2), Chludil, Hugo (3)

(1) INTI Gerencia de Proyectos Especiales, (2) INTI Biotecnología Industrial, (3) Facultad de Agronomía, UBA

germans@inti.gov.ar

Introducción

Durante su almacenamiento los alimentos sufren procesos oxidativos que deterioran su valor nutricional, su salubridad y sus cualidades organolépticas, reduciendo así su vida útil. Como fuente principal de los procesos oxidativos se señalan a los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (conocidas como ROS). Los primeros antioxidantes que se usaron en la industria para contrarrestar estos efectos fueron sustancias naturales, las cuales fueron con el tiempo reemplazadas por sustancias sintéticas, más baratas, con mayor grado de pureza y con propiedades más uniformes. Sin embargo, hoy los consumidores cuestionan el elevado uso de aditivos sintéticos, por sus potenciales riesgos para la salud, volcando sus preferencias hacia sustancias más naturales.

En las últimas décadas se han reportado gran cantidad de proteínas y de péptidos con capacidad antioxidante, provenientes de muy variadas fuentes. Usualmente, el método preferido para obtener péptidos activos es la hidrólisis enzimática de proteínas, llevada a cabo bajo condiciones suaves y controladas que no disminuyen el valor nutricional de las moléculas logradas y generan pocos productos secundarios no deseados. Con una hidrólisis enzimática se rompen los enlaces peptídicos de una proteína para obtener fragmentos de diferentes tamaños (péptidos). Como el tamaño de los péptidos influye en gran medida sobre su funcionalidad, es esencial controlar el grado de hidrólisis alcanzado durante el proceso.

Objetivo

Evaluar el potencial como aditivo alimentario humano del plasma bovino deshidratado, el cual es un subproducto de la industria cárnica que se destina sólo a alimentación animal, con vistas a aumentar su valor agregado.

Se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Obtener hidrolizados enzimáticos de plasma bovino deshidratado con diferentes grados de hidrólisis.
- Evaluar la Capacidad Antioxidante de los hidrolizados obtenidos, comparándolos entre sí y con el plasma original.

Descripción

Hidrólisis enzimática

Se prepararon 1.500 cm³ de una dispersión al 5 % (p/v) de plasma bovino deshidratado (Productos Pilar S.A.), que luego recibió un pretratamiento térmico de 20 min a 95 °C en un baño termostático con agitación y homogeneización con Ultra Turrax durante 2 min a 10.000 rpm. El sustrato así preparado se colocó en un biorreactor de vidrio (New Brunswick), a una temperatura de 60 °C y una agitación de 200 rpm. El pH de la reacción se mantuvo constante en 8 con el agregado automático de NaOH 0,5 N, registrándose permanentemente el volumen de base adicionada. La reacción se inició agregando 6 cm³ de la enzima proteasa Alcalase 2.4 L FG (Novozymes), en una relación enzima/sustrato del 2 %. A los 20 min de la reacción se retiró la mitad del volumen de la muestra, con el fin de obtener un hidrolizado de bajo grado de hidrólisis. Con el remanente se siguió la reacción hasta los 240 min de proceso, para alcanzar un grado de hidrólisis alto. Las muestras cosechadas fueron colocadas en baño térmico a 95 °C durante 10 min para inactivar la enzima y luego fueron centrifugadas durante 20 min a 10.000 g. Los sobrenadantes obtenidos fueron congelados hasta su posterior utilización. El ensayo se repitió, en las mismas condiciones, para tener un duplicado, partiendo de una dispersión de plasma independiente.

Determinaciones analíticas

La cantidad de proteínas totales de las distintas muestras se valoró mediante el método de Lowry. La cantidad de péptidos liberados por la hidrólisis se evaluó midiendo los grupos amino libres por el método de OPA (Church y col., 1983). El avance de la reacción se evaluó mediante perfil proteico por SDS-PAGE y por FPLC con una columna Superdex Peptide 10/300 GL (GE).

El grado de hidrólisis alcanzado se estimó por el método de pH-estato (Guadix y col., 2000).

Capacidad Antioxidante

Se evaluó la actividad de secuestro de los radicales DPPH y ABTS. Para el primero se usó el método explicado en Shimada y col. (1992) y para el segundo el método descrito por Thiansilakul y col. (2007).

Análisis estadístico

Los ensayos de Capacidad Antioxidante se realizaron por triplicado. La significancia de los efectos principales se determinó mediante un ANOVA de un factor. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las medias se identificaron mediante el test de comparaciones múltiples a posteriori de Duncan.

Resultados

Hidrolizados enzimáticos

Con la hidrólisis enzimática del plasma se obtuvieron dos hidrolizados, con Grados de Hidrólisis estimados de 13 % y de 28 %, respectivamente. Al comparar los hidrolizados con el plasma inicial por SDS-PAGE (FIGURA 1), puede apreciarse en los hidrolizados una disminución de las bandas proteicas de mayor peso molecular respecto del plasma y la aparición de proteínas de bajo peso molecular en los hidrolizados. Esta observación es consistente con las mediciones analíticas (TABLA 1), que reflejan claramente el descenso en la concentración de proteínas totales con el progreso de la hidrólisis, que se corresponde con el consecuente aumento en la concentración de péptidos libres. La eficacia del proceso hidrolítico también se pudo comprobar con las cromatografías de exclusión molecular realizadas con el plasma y sus hidrolizados (datos no mostrados).

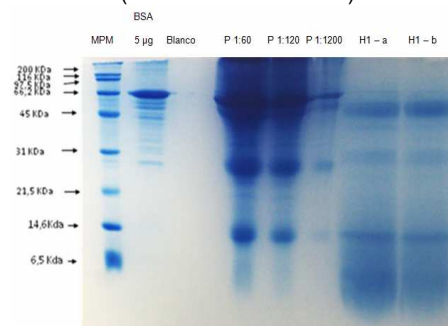


FIGURA 1: SDS-PAGE del Plasma y de sus hidrolizados. Tinción con Coomassie coloidal. Referencias: MPM: Marcadores de Peso Molecular; BSA: Albúmina bovina sérica; Blanco: buffer de corrida; P: plasma original, en distintas diluciones; H1 y H2: hidrolizados.

Tabla 1: Concentración de proteínas totales y de péptidos		
	Proteínas Totales (mg/ml)	Péptidos Libres (mg/ml)
Plasma Inicial	53,8 ± 2,55	32,7 ± 0,21
H1: Hidrolizado 13%	4,5 ± 0,07	115,4 ± 2,33
H2: Hidrolizado 28%	3,4 ± 0,07	231,3 ± 18,74

Capacidad Antioxidante

En la Figura 2 A se presenta la capacidad de secuestro de radicales DPPH del plasma y de sus dos hidrolizados obtenidos, y en la FIGURA 2 B se hace lo propio con la capacidad de secuestro de radicales ABTS. Con ambos métodos se observó un aumento altamente significativo ($p < 0,001$) de la capacidad antioxidante del plasma deshidratado al ser hidrolizado con la enzima Alcalase con un grado de hidrólisis del 13 %. También con ambos métodos se vió un aumento significativo ($p < 0,05$) de la actividad antioxidante al incrementarse el GH de 13 % a 28 %.

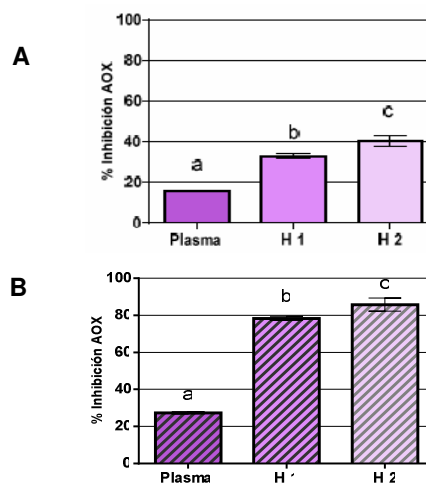


FIGURA 2. Capacidad Antioxidante. (A): DPPH; (B): ABTS. Cada barra representa la media de dos muestras ± Desviación Estándar. Barras con letras diferentes difieren significativamente ($p < 0,05$).

Conclusiones

La enzima Alcalase, en las condiciones ensayadas, resultó efectiva para hidrolizar las proteínas del plasma bovino deshidratado, obteniéndose fragmentos proteicos y péptidos de distinto tamaño molecular.

La hidrólisis enzimática con Alcalase aumentó marcadamente la Capacidad Antioxidante del plasma deshidratado, y esa mayor actividad antioxidante resultó asociada al menor tamaño de los péptidos obtenidos con un mayor grado de hidrólisis.

Los hidrolizados obtenidos a partir del plasma bovino deshidratado con la enzima Alcalase demostraron poseer un alto potencial antioxidante, que de cumplir con las condiciones higiénico-sanitarias pertinentes, los haría viables para ser utilizados como aditivos conservantes para reducir el enranciamiento lipídico de los alimentos, y así prolongar su vida útil.