

# OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS DERIVADOS DE SUBPRODUCTOS BOVINOS PARA APLICACION EN LA INDUSTRIA

Rousseau, I.<sup>(1)</sup>; Simonetti, G.<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>INTI Carnes, <sup>(2)</sup>INTI Biotecnología Industrial

rousseau@inti.gob.ar

## **OBJETIVO**

Establecer las mejores condiciones para la obtención de péptidos a partir de harina de hueso y harina de sangre.

- Se acondicionarán los subproductos para una óptima hidrólisis enzimática.
- Se seleccionarán las mejores condiciones de hidrólisis.

## **DESCRIPCIÓN**

La harina de hueso y la harina de sangre contienen una cantidad considerable de proteínas y solo una pequeña porción es utilizada en la industria alimenticia. Una alta cantidad se utiliza como fertilizante y una proporción importante es directamente descartada. Por otro lado, los alimentos funcionales tuvieron mucha atención en estos últimos tiempos por el concepto de "lo saludable". Los péptidos derivados de la hidrólisis proteica de diferentes subproductos fueron investigados durante décadas y mostraron propiedades bioactivas como: capacidad antihipertensiva (anti-ACE), capacidad antioxidante, acción antimicrobial, antitumoral (Cheng Fu-Yuan y col., 2008). De esta manera, estos péptidos tienen un potencial como nutraceuticos y pueden ser utilizados como ingredientes en la formulación de alimentos funcionales.

Nuestro trabajo intenta intervenir en la valorización de estos subproductos a través de la obtención de compuestos bioactivos (péptidos) para diferentes usos en la industria alimenticia utilizando proteasas en la hidrólisis.

El centro de Carnes encara el desarrollo y la implementación de técnicas y procesos para una futura transferencia al sector industrial. En este marco se realizó, dentro de un proyecto de colaboración con el centro de Biotecnología, la optimización de la obtención de péptidos bioactivos con propiedades funcionales específicas. Estos péptidos son producidos gracias a la hidrólisis por proteasas de origen bacteriano (*Bacillus licheniformis*) y de páncreas porcino. Estas proteasas son enzimas comerciales que se utilizan ampliamente en la industria alimenticia y la de detergentes por sus condiciones simples de ensayo.

Sin embargo, la optimización del proceso de hidrólisis para la obtención de péptidos

depende no solo de la preparación del sustrato sino también de las condiciones de hidrólisis. De esta manera, se realizó un estudio sobre extracción de grasa y desnaturalización de proteínas en el material de partida que producen una condición de hidrólisis óptima de la actividad enzimática.

Huesos bovinos recolectados de frigoríficos fueron triturados por medio de un molino de martillo. El triturado fue sujeto a un tratamiento de desgrasado utilizando diferentes métodos. Uno de los tratamientos consistió en calentar hueso y agua (1/4) a la temperatura entre 60-70 °C durante 9 h. Una vez obtenidas las muestras desgrasadas, se procedió al filtrado y secado en estufa a 55 °C durante 24 h. El ensayo de desgrasado con hexano consistió en agitar hueso y hexano (1/5) por 15 min realizando 2 recambios del solvente. La solución se filtró y los huesos se secaron en estufa a 70 °C en un tiempo de 16 h. El mismo procedimiento se efectuó para el desgrasado con acetona. En todos los casos los huesos desgrasados se molieron en molino de impacto. Se le realizaron análisis fisicoquímicos de humedad, proteína, cenizas y grasas según métodos de AOAC a todas las etapas del proceso. La harina de sangre fue suministrada por una fábrica de procesado de subproductos. Experimentos preliminares mostraron que la harina de sangre en el estado natural no fue susceptible a la hidrólisis por la enzima. Por lo tanto se llevó a cabo un pretratamiento con calor a 90 °C por 5 min para desnaturalizar las proteínas y probar la susceptibilidad a la hidrólisis.

Una vez realizada la hidrólisis y obtenido los péptidos por varios pasos de purificación, se evaluó la funcionalidad por medio de la determinación de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de Angiotensina (ACE) según Hurst y Lowell-Smith (1981).

## **RESULTADOS**

### *Composición de la materia prima y pre-tratada*

Se realizó un análisis fisicoquímico de los huesos frescos y del material pre-tratado con los diferentes métodos de extracción de grasa. El desgrasado con hexano arrojó valores de rendimiento proteico superior a los otros métodos descriptos. El desgrasado de las muestras aplicando una temperatura de 70 °C

arrojó valores de rendimiento proteico inferior a los métodos mencionados. Estos resultados pueden explicarse por la naturaleza polar del agua que disuelve parte del material colagénico y proteínas solubles presentes en los huesos. El contenido remanente de grasa para la muestra desgrasada con hexano fue del 0,5%. Valores superiores se observaron en las muestras desgrasadas tanto con calor como con acetona (4,4% y 3,4% respectivamente).

#### Grado de Hidrólisis (GH)

El GH se usa generalmente como parámetro de la proteólisis. En la Fig. 1 se muestran los cambios en los contenidos peptídicos durante la hidrólisis enzimática de los huesos y de la sangre. La hidrolización enzimática de los huesos resultó en un alto GH a las 4 h. En el estado natural la harina de sangre mostró una resistencia a la hidrólisis con la enzima tripsina en las dosis especificadas y arrojó un bajo valor de GH (menos del 3%). El aumentar la dosis de la enzima 4 veces (2% ez/prot) incrementó significativamente el GH. Sin embargo, cuando la harina se trató previamente con calor los valores de GH aumentaron 4 veces más.

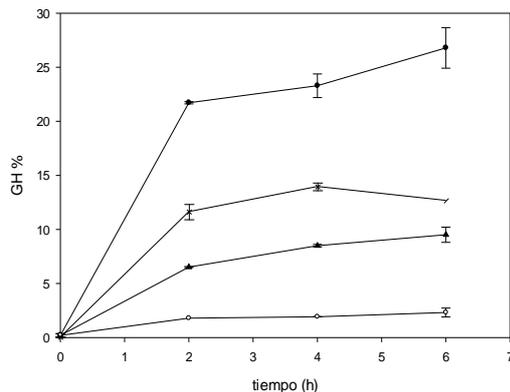


Figura 1. Cambios en el GH. Hidrólisis de sangre. (○) Sin tratamiento previo con calor 0.5% (ez/prot), (▲) Sin tratamiento previo con calor 2% (ez/prot), (●) 90 °C, 5 min 2% (ez/prot). Hidrólisis de hueso (×).

#### Análisis por SDS-Page de las muestras de sangre

El patrón de proteínas de los hidrolizados de sangre con o sin pretratamiento con calor se muestra en la Figura 2 y Figura 3. En ausencia de pretratamiento con calor no se observaron diferencias en el patrón de corrida de las proteínas después de la hidrólisis con respecto a los controles en cada uno de los tiempos medidos (Fig. 2). Sin embargo, en las muestras pre-tratadas con calor se visualizó una desaparición de ciertas bandas luego de la hidrólisis en todos los tiempos de incubación (Fig. 3). Este ensayo indica tanto una actividad enzimática eficiente luego del calentamiento, como así también corrobora el aumento en el

GH de los hidrolizados en las muestra calentadas (Fig. 2).

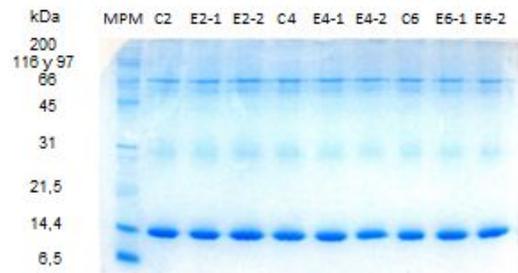


Figura 2. Cambios en el patrón de electroforesis SDS-Page de los hidrolizados a los tiempos 2,4 y 6h. MPM: Marker. C: control. 1: antes de hidrólisis. 2: después de hidrólisis.

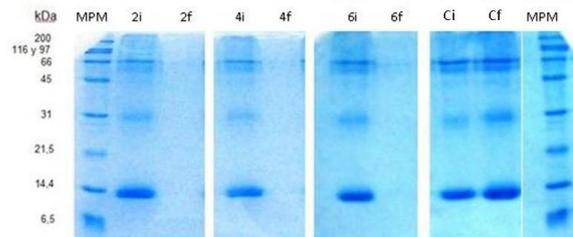


Figura 3. Cambios en el patrón de electroforesis SDS-Page a los tiempos 2,4 y 6h. Muestras calentadas a 90 °C. i: antes de hidrólisis. f: después de hidrólisis. C: control.

#### Inhibición de la actividad ACE

Resultados preliminares después de 2 h de incubación con la proteasa indican una actividad inhibitoria 5 veces mayor comparado con el control sin enzima ( $IC_{50} = 0,02$  mg/ml vs 0,1 mg/ml respectivamente).

#### CONCLUSIONES

Los datos presentados hasta aquí muestran que el mejor proceso de desgrasado de las muestras es a través de la aplicación de hexano, registrando una pérdida poco significativa del contenido proteico y con una mayor reducción del contenido graso. Por otro lado, el pretratamiento de la harina de sangre con calor produjo una proteólisis más efectiva, probablemente debido a que el calor induce la desnaturalización de las proteínas y por lo tanto se vuelven más susceptibles al ataque por las proteasas.

A partir de estos resultados preliminares podemos concluir que, en las condiciones evaluadas, las enzimas estudiadas obtuvieron mayor cantidad de péptidos a las 4 h de incubación.

Queda por evaluar la actividad de ACE en los otros tiempos indicados.

#### Bibliografía

- Cheng, F., Liu, Y., Wan, T., Lin, L., y Sakata, R. *Animal Science Journal*. 2008. 79: 122–128.  
 Hurst, P. L. y Lovell-Smith, C. J. *Clin. Chem*. 1981. 27/12: 2048-2052.