



**RIDUNAJ**  
Repositorio Institucional  
Digital UNAJ



## Tesinas de Grado

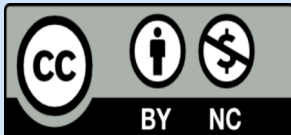
Santone, Nadia Analía

# Aprovechamiento de residuos proteicos de la industria aceitera : obtención de hidrolizados y evaluación de las actividades antioxidante y antibacteriana

2024

*Instituto de Ciencias de la Salud*

*Carrera: Bioquímica*



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.

Atribución – No comercial 4.0

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Santone, N. A. (2024) *Aprovechamiento de residuos proteicos de la industria aceitera : obtención de hidrolizados y evaluación de las actividades antioxidante y antibacteriana* [Tesis de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]. <https://rid.unaj.edu.ar/handle/123456789/3066>



Instituto Ciencias de la Salud

Bioquímica

Trabajo final:

*“Aprovechamiento de residuos proteicos de la industria aceitera: obtención de hidrolizados y evaluación de las actividades antioxidante y antibacteriana”*

Estudiante: Santone, Nadia Analía

Directora: Dra. Errasti, María Eugenia

Co-directora: Dra. López, Laura María Isabel

Fecha de entrega: 29/11/2024

## **Agradecimientos**

A la universidad pública, en especial a la Universidad Nacional Arturo Jauretche que me dio la oportunidad de formarme académicamente y transitar esta hermosa carrera.

A la Dra. Errasti, María Eugenia y la Dra. López, Laura María Isabel mi directora y co-directora de tesis por estar siempre dispuestas a ayudarme y compartirme sus conocimientos.

A cada uno los profesores que fueron parte de mi formación, por su esfuerzo y vocación a la enseñanza.

A los amigos que me dio la facultad en tantas horas compartidas de estudio.

A mis padres, especialmente mi madre por su apoyo incondicional.

¡Muchas gracias a todos!

## Resumen

El objetivo del presente trabajo final fue evaluar el uso de preparados enzimáticos de origen vegetal para obtener hidrolizados conteniendo péptidos bioactivos a partir de proteínas recuperadas desde desechos de la industria aceitera.

Los hidrolizados fueron obtenidos enzimáticamente usando como sustrato el concentrado proteico de girasol (CPG) y como enzimas preparados proteolíticos vegetales obtenidos de *Carica papaya* y *Pseudananas macrodontes*. A efecto de caracterizar los hidrolizados se llevaron a cabo diferentes métodos experimentales: se les determinó la concentración de proteínas solubles mediante el método de Bradford y el grado de hidrólisis por el método del OPA (O-ftaldehído). Además, empleando Tricina-SDS-PAGE se estableció el patrón electroforético de la muestra original de proteínas de girasol que fue caracterizado y comparado con los perfiles peptídicos de los hidrolizados. Para determinar la presencia de péptidos bioactivos en los hidrolizados obtenidos se evaluó la actividad antioxidante empleando el método del DDPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y también fue ensayada la actividad antimicrobiana.

## INDICE

I.	INTRODUCCIÓN .....	5
I.1	LA INDUSTRIA ACEITERA .....	5
I.1.1	Composición química de las semillas de girasol y sus harinas proteicas .....	6
I.2	HIDRÓLISIS.....	7
I.2.1	Generalidades.....	7
I.2.2	Enzimas.....	8
I.2.2.1	Clasificación de Enzimas .....	10
I.2.2.2	Enzimas cisteínicas de <i>Carica papaya</i> (papaína) .....	13
I.2.2.3	Enzimas cisteínicas de <i>Pseudananas macrodentes</i> (Pm).....	14
I.3	HIDROLIZADOS PROTEICOS.....	16
I.3.1	Aspectos generales .....	16
I.3.2	Compuestos e ingredientes bioactivos.....	16
I.3.3	Péptidos bioactivos.....	16
I.3.4	Propiedades antioxidantes.....	17
I.3.5	Propiedades antimicrobianas.....	17
II.	OBJETIVOS .....	19
II.1	OBJETIVO GENERAL.....	19
II.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	19
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
III.1	OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DE PREPARADOS PROTEOLÍTICOS .....	20
III.1.1	Obtención del extracto proteolítico de <i>Carica papaya</i> (Cp).....	20
III.1.2	Obtención del extracto proteolítico de <i>Pseudananas macrodentes</i> (Pm) .....	20
III.1.3	Obtención del extracto parcialmente purificado denominado (PER <sub>Pm</sub> ).....	20
III.1.4	Liofilización de las preparaciones proteolíticas .....	21
III.1.5	Medida de la actividad proteolítica.....	21
III.2	OBTENCIÓN DEL SUSTRATO PROTEICO.....	21
III.3	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	22
III.3.1	Obtención de los hidrolizados .....	22
III.3.2	Determinación de la concentración de proteínas solubles .....	22
III.3.3	Determinación del grado de hidrólisis (GH) .....	23

III.3.4	Análisis electroforético (Tricina-SDS-PAGE) .....	23
III.3.5	Determinación de actividad antioxidante .....	26
III.3.6	Actividad antimicrobiana .....	26
III.3.7	Análisis estadístico.....	26
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	27
IV.1	CARACTERIZACIÓN DE LOS PREPARADOS PROTEOLÍTICOS .....	27
IV.1.1	Actividad proteolítica .....	27
IV.1.2	Determinación de la concentración de proteínas .....	29
IV.2.	OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS .....	31
IV.2.1.	Determinación de la concentración de proteínas solubles .....	31
<b>IV.2.2.</b>	<b>Determinación del grado de hidrólisis (GH)</b> .....	33
IV.2.3	Análisis electroforético (tricina-SDS-PAGE) .....	35
IV.2.3.	Determinación de actividad antioxidante.....	36
IV.2.4.	Determinación de actividad antimicrobiana.....	37
V.	CONCLUSIONES .....	40
VI.	BIBLIOGRAFIA .....	41

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1 LA INDUSTRIA ACEITERA

Argentina se destaca como uno de los principales productores y exportadores de aceite de girasol (*Helianthus annuus L.*) en el mundo. Por esta razón, es importante revalorizar los subproductos generados durante el proceso de extracción y refinado del aceite. Uno de estos subproductos es una harina proteica que se obtiene después de la extracción del aceite. Para facilitar su transporte, esta harina se convierte en pellets de girasol (1). En la actualidad, estos pellets se utilizan principalmente en la alimentación animal (2).

La Figura I.1 muestra un diagrama de flujo del procesamiento de semilla de girasol para la producción de aceite. El proceso comienza con el prensado de la semilla, el cual consigue transformar entre el 25% y el 33% del peso inicial de la semilla en aceite, dependiendo del protocolo utilizado. Luego, todo el residuo de la semilla de girasol se somete a un nuevo proceso de extracción utilizando disolvente, generalmente hexano o metanol y se genera harina/torta de girasol desgrasada como subproducto. Después de esto, se realiza el paso de filtración o decantación del aceite, cuyo propósito es separar los residuos. La extracción del aceite da como resultado un subproducto que representa alrededor del 36% de la masa de la semilla procesada (3).

Este subproducto contiene nutrientes de interés para elaborar o enriquecer alimentos para consumo humano y que no son aprovechados. Por esto, el desarrollo de un proceso enzimático para el reaprovechamiento de los residuos proteicos puede tener un impacto, no sólo en la implementación de tecnologías limpias en la industria para minimizar los residuos y aprovecharlos dando sustentabilidad del proceso a través de la economía circular, sino también en el desarrollo de alimentos funcionales y nutraceuticos.

El aumento de interés en el aprovechamiento de los subproductos de las agroindustrias ricos en proteínas llevó al desarrollo de procesos de obtención de concentrados y aislados proteicos, así como también al estudio de las propiedades funcionales de las mismas. Con respecto a los aislados, presentan dos grandes limitaciones para su aplicación en la industria alimentaria como son su baja solubilidad y potencial alergenicidad (4). Una manera de solucionar estos problemas es hidrolizar dichas proteínas.

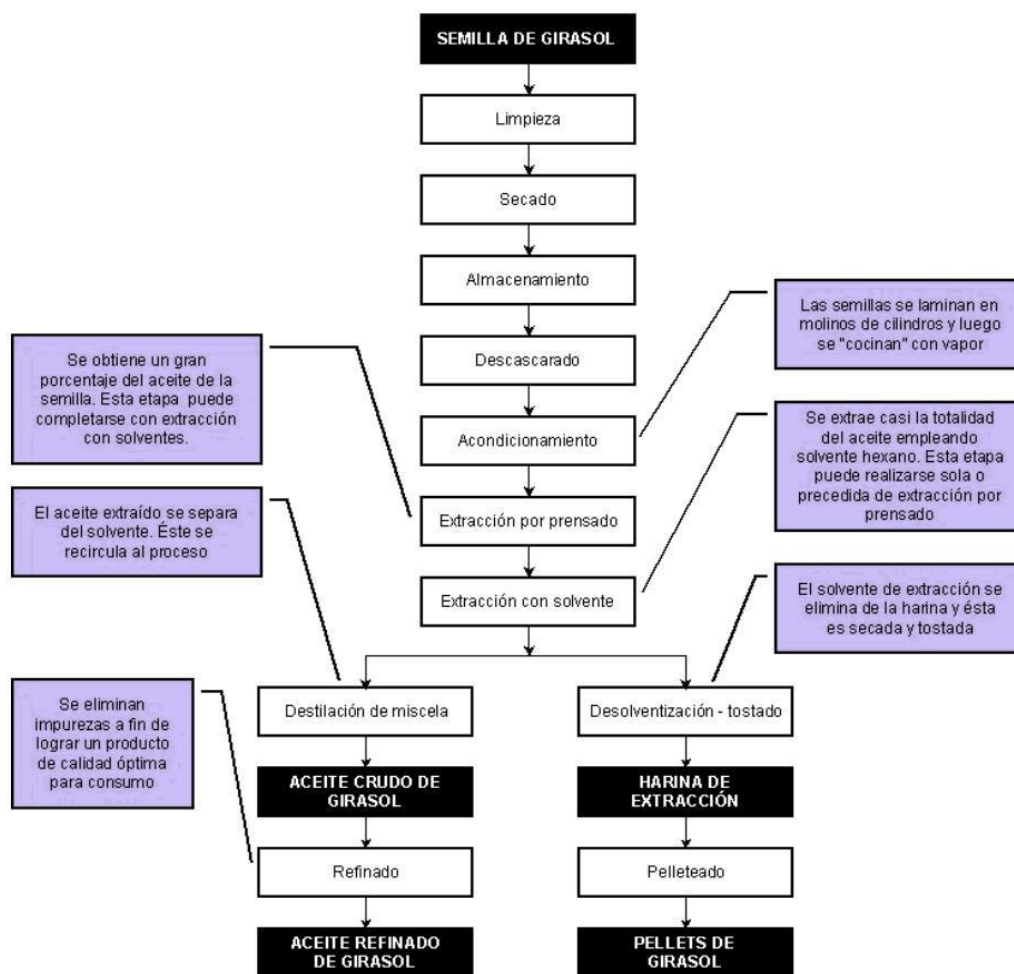


Figura I.1 – Diagrama de Proceso Industrial del aceite de girasol (Fuente: <https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/HomeAlimentos/Aceites%20y%20Oleaginosas/>)

### I.1.1 Composición química de las semillas de girasol y sus harinas proteicas

La semilla de girasol está compuesta por un embrión, que constituye el núcleo de la semilla, y está rodeado por su tegumento seminal y el pericarpio (o cáscara). El embrión representa entre el 75% y el 80% del peso seco total de la semilla y contiene dos cotiledones que almacenan las reservas de lípidos y proteínas esenciales para la germinación. Por otro lado, el pericarpio constituye el 20% al 25% restante del peso seco de la semilla y está compuesto principalmente por lignocelulosa (5).

Tanto las semillas enteras de girasol como las descascaradas son ricas en componentes lipídicos, predominando los triglicéridos neutros, fosfolípidos, glicolípidos y ceras. Además, estas semillas contienen significativas cantidades de proteínas e hidratos de carbono. La cáscara

aporta principalmente fibras y compuestos fenólicos mientras que el pellet residual posee elevados porcentajes de proteínas e hidratos de carbono. Las dos proteínas de almacenamiento más abundantes en las semillas de girasol son las globulinas 11S (60–80 %) y las albúminas 2S (20–30 %).

La harina de girasol contiene proteínas de alto valor biológico ricas en aminoácidos esenciales como lisina, metionina, cisteína y triptófano. Además, contiene otros compuestos valiosos como fibras, vitaminas, minerales y polifenoles como el ácido clorogénico.

En comparación con otros subproductos como la harina de semilla de algodón, la harina de soja y el salvado de maíz, el subproducto de semilla de girasol tiene niveles más altos de minerales, compuestos fenólicos y actividad antioxidante, y una menor presencia de compuestos antinutricionales (inhibidores de tripsina y quimiotripsina principales enzimas digestivas).

La harina de girasol tiene hasta 4% de su masa en compuestos fenólicos, y el componente mayoritario es el ácido clorogénico. El ácido clorogénico exhibe una serie de propiedades beneficiosas para la salud humana, incluyendo actividades antioxidantes, antidiabéticas, antihipertensivas, quimiopreventivas, antimicrobianas y antiinflamatorias (6).

## **I.2 HIDRÓLISIS**

### **I.2.1 Generalidades**

La hidrólisis de una proteína consiste en la rotura del enlace peptídico generándose así péptidos de menor tamaño o incluso aminoácidos libres. Esto puede ser llevado a cabo por procesos químicos, físicos, así como por métodos enzimáticos. La hidrólisis enzimática presenta indudables ventajas frente a la hidrólisis química, entre las que cabe mencionar las siguientes:

- **Selectividad.** A diferencia de los ácidos y las bases, las enzimas son específicas para un determinado tipo de enlace peptídico.
- **Condiciones moderadas de temperatura y pH.** Además de las ventajas industriales que representan estas condiciones, permiten mantener el valor nutritivo. Esto último no ocurre en la hidrólisis alcalina en la que se destruyen los aminoácidos arginina y cisteína, ni en la hidrólisis ácida ya que se elimina el triptófano y desamina los aminoácidos serina y treonina

Por otro lado, la acción de ácidos y bases pueden dar lugar a la aparición de productos que pueden llegar a ser tóxicos (7).

Además de estas ventajas, las enzimas pueden ser inactivadas luego del proceso de hidrólisis, por lo que no hace falta su remoción (8).

Los hidrolizados proteicos se pueden utilizar como un ingrediente alimenticio básico, ya sea por sus propiedades funcionales, fácil digestibilidad, elevada solubilidad en agua, resistencia a agentes desnaturalizantes, elevado contenido proteico y gran potencial como saborizante, como por su contenido en péptidos con diferentes actividades biológicas. Por lo tanto, los métodos enzimáticos son una herramienta muy importante para modificar las proteínas, obtener hidrolizados y aprovechar sus propiedades (9).

### **I.2.2 Enzimas**

Las enzimas son proteínas que tienen la capacidad de acelerar las reacciones químicas que tienen lugar en los tejidos vivos (catalizadores biológicos), disminuyendo el nivel de energía de activación propia de la reacción. Estas no reaccionan químicamente con el sustrato, ni alteran el equilibrio de la reacción. Sólo aumentan la velocidad con que ésta se produce. Las reacciones catalizadas por enzimas se caracterizan por la formación de un complejo entre el sustrato y el enzima (complejo ES), mientras que el sitio de unión al sustrato de la enzima se llama sitio activo. En la Figura I.2 se muestra un esquema del mecanismo de catálisis de una enzima.

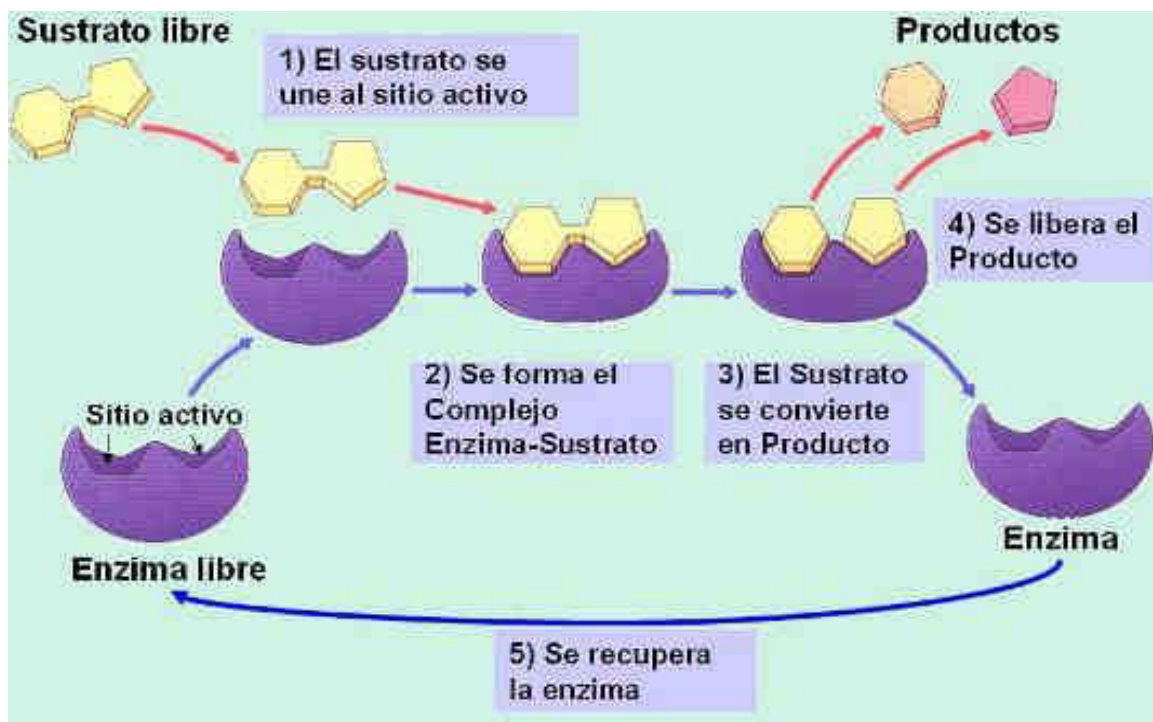


Figura I.2 – Esquema de catálisis llevada a cabo por una enzima. Las enzimas no reaccionan químicamente con el sustrato, permaneciendo inalterada luego de la reacción (Guadix et al, 2000).

La velocidad ( $V$ ) de una reacción enzimática se puede definir como la cantidad de moléculas del sustrato que se transforma en producto por segundo. A medida que la concentración de sustrato  $[S]$  aumenta, la  $V$  se aproxima asintóticamente a la velocidad máxima  $V_{\max}$ , aunque nunca la alcanza por completo. Por esta razón, no existe una concentración de sustrato  $[S]$  específica que permita alcanzar  $V_{\max}$  (Figura I.3).

Se puede definir un parámetro característico de la enzima empleando la  $[S]$  a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima ( $V_{\max}/2$ ). Esta concentración de sustrato se conoce como constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ). Para enzimas que exhiben una cinética de Michaelis-Menten simple esta constante representa la constante de disociación del complejo enzima-sustrato (ES) (o la inversa de la afinidad entre enzima y sustrato). Valores bajos indican que el complejo ES está unido muy fuertemente y raramente se disocia sin que el sustrato reaccione para dar producto. En estos casos se obtendrá una  $K_M$  diferente según el sustrato específico sobre el que actúe la enzima (como sucede en el caso de enzimas que actúan sobre sustratos análogos) y según las condiciones de reacción en que se realicen las mediciones (10).

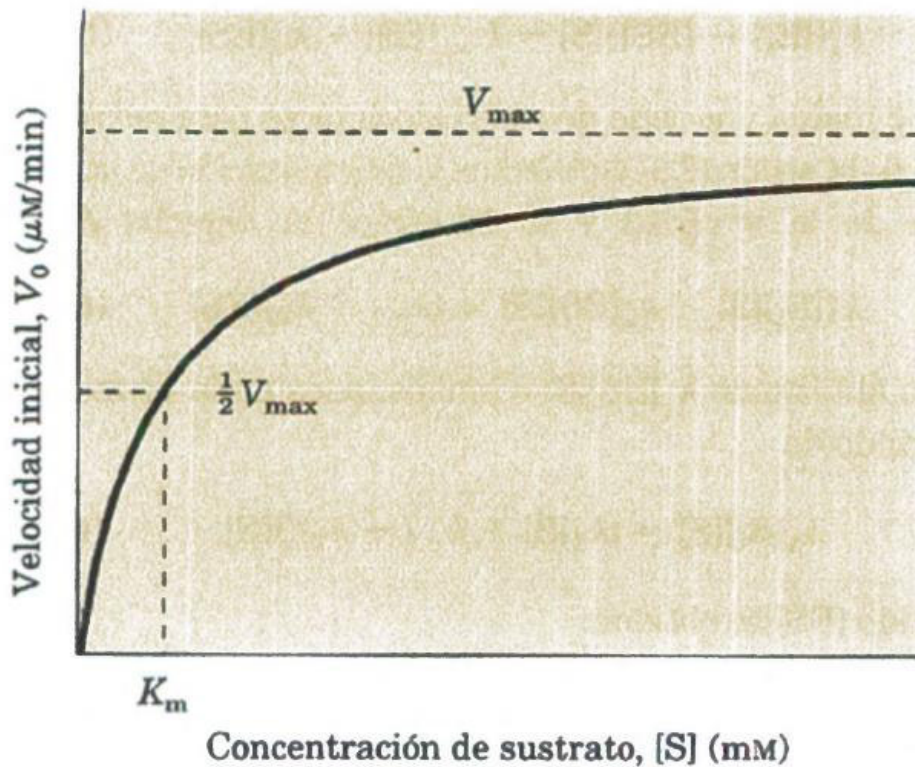


Figura I.3 – Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima.

Al analizar las curvas cinéticas en reacciones enzimáticas, es común identificar una fase inicial donde el consumo de sustrato o la generación de producto siguen una relación lineal con el tiempo. En esta fase, la pendiente se denomina *velocidad inicial* y sirve como indicador de la actividad enzimática. Si la concentración de sustrato es saturante, la *velocidad inicial* es la  $V_{\text{max}}$  y es característica de cada enzima en las condiciones de ensayo, sirviendo como medida de la actividad enzimática (11).

### I.2.2.1 Clasificación de Enzimas

Las enzimas que desempeñan el rol central en la degradación de las proteínas han sido conocidas tradicionalmente como "proteasas", término equivalente al de "enzimas proteolíticas" y también al más moderno de "péptido-hidrolasas" o "peptidasas". Dichas enzimas constituyen uno de los grupos más extensos de proteínas (12), con más de 800 peptidasas actualmente incluidas en la base de datos MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>). Debido a que las proteasas muestran una gran diversidad de

mecanismos de acción y estructuras, es difícil establecer una clasificación general. Por ello, se ha propuesto describirlas según las siguientes categorías.

#### **a) Origen**

- Animal. Estas enzimas son relativamente caras y su disponibilidad depende usualmente de la cría y comercio de estos animales.
- Vegetal. La mayoría de las proteasas de origen vegetal, tales como papaína, son fáciles de extraer, pero su abastecimiento está también determinado por la demanda del vegetal.
- Microbiano. Estas se pueden subclasificar en bacterianas o fúngicas. Las primeras son muy diversas y abundantes. Siendo las más conocidas y estudiadas las sintetizadas por las diferentes especies del género *Bacillus*.

Las enzimas proteolíticas de origen vegetal son capaces de actuar en un amplio rango de valores de pH (4,0 a 11,0) y sobre una gran diversidad de sustratos. Sin embargo, son menos termo-resistentes que las de origen bacteriano.

#### **b) Acción catalítica**

De acuerdo con la “International Union of Biochemistry and Molecular Biology” (1992), las proteasas pertenecen al grupo 3 (hidrolasas) y dentro de éste al subgrupo 4 (peptidasas). Según este criterio, las mismas se clasifican en (Figura I.4):

- Exopeptidasas: cuando hidrolizan un enlace peptídico no sustituido próximo al extremo amino o carboxilo terminal del sustrato, denominándose aminopeptidasas o carboxipeptidasas, respectivamente.
- Endopeptidasas: cuando hidrolizan las cadenas peptídicas en regiones internas alejadas de los extremos amino o carboxilo terminal.

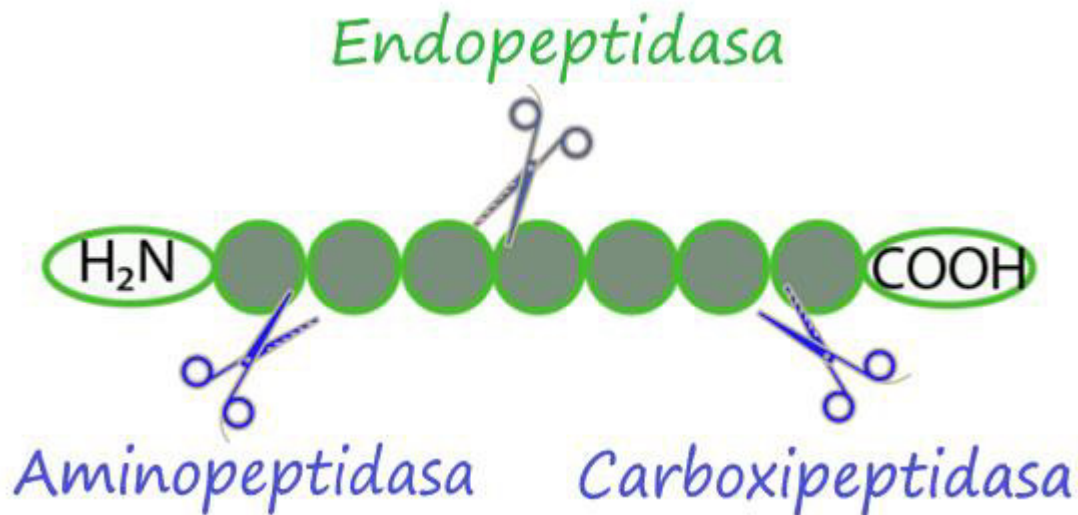


Figura I.4. Tipos de peptidasas (Enzyme Nomenclature List of International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1992).

### c) La naturaleza del sitio catalítico

Las proteasas difieren de casi todas las demás enzimas en que su especificidad de sustrato resulta extremadamente difícil de definir, hecho que llevó a Hartley (1960) a proponer una clasificación de las mismas basada en las características de sus respectivos mecanismos catalíticos, constituyendo en la actualidad seis sub-subgrupos en la clasificación internacional: endopeptidasas serínicas, endopeptidasas cisteínicas, endopeptidasas aspárticas (primeramente denominadas proteasas ácidas), metaloendopeptidasas, endopeptidasas treonínicas y endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido. Cada una de las clases de proteasas mencionadas posee un mecanismo catalítico distintivo, pero aún así pueden agruparse en dos grandes categorías: las que forman complejos covalentes entre la enzima y el sustrato (serínicas y cisteínicas) y las que no forman complejos enzima sustrato covalentes (aspárticas y metalopeptidasas) (13).

- **Peptidasas serínicas:** se caracterizan por la presencia de residuos de serina en su sitio activo. El mecanismo catalítico de estas enzimas requiere, además del residuo de serina, otros residuos como histidina, aspártico o lisina para su acción (14). Generalmente, son activas tanto a valores de pH neutros como alcalinos, pero exhiben su máxima actividad en esta última condición.

- **Peptidasas cisteínicas:** se distinguen por poseer en su sitio activo un grupo sulfhidrilo en lugar de un grupo hidroxilo. Son activas generalmente a pH neutro y no son sensibles a la acción de agentes quelantes.

- **Metalopeptidasas:** se caracterizan porque requieren de un ión divalente esencial para actuar. El cinc ( $Zn^{2+}$ ) es el metal más frecuente, aunque también se ha descrito la presencia de cobalto ( $Co^{2+}$ ) o manganeso ( $Mn^{2+}$ ). Presentan su mayor actividad a pH neutro y son inhibidas por quelantes de metales, tales como el etilendiaminotetracético (EDTA) (15).

- **Peptidasas aspárticas y glutámicas:** poseen un grupo carboxílico (Aspártico), en su sitio catalítico. Son también conocidas como proteasas ácidas ya que presentan actividad en un rango de pH de 2,0 a 6,0 (16).

### **I.2.2.2 Enzimas cisteínicas de *Carica papaya* (papaína)**

La papaína es una endopeptidasa cisteínica de 23,4 kDa y 212 residuos que se obtiene del látex de frutos inmaduros de la planta de papaya (*Carica papaya*). En la Figura I.5 se muestran frutos de papaya.



Figura I.5. Frutos de *C. papaya*

La papaína es un componente menor (5-8%) entre las endopeptidasas de la papaya, tales como la quimopapaína, la caricaína y la glicil endopeptidasa.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que también se denomina papaína al conjunto de las enzimas proteolíticas extraídas del látex de *C. papaya*. Este extracto comercializado como papaína (o papaína cruda) es uno de los más utilizados en la industria alimentaria en todo el mundo, mostrando una actividad endopeptidásica con amplio espectro de corte en un rango de pH entre 5 a 8 y una temperatura óptima de 65 °C (17).

La importancia comercial de la papaína se debe principalmente a su fuerte actividad proteolítica frente a una gran variedad de sustratos proteicos y a que es activa en una amplia gama de condiciones de trabajo. Por estas propiedades es que la papaína ha despertado un creciente interés en una amplia gama de usos industriales, principalmente para ablandar carnes, en alimentos, elaboración de cerveza y la industria textil. La papaína también se ha descrito como un aditivo activo en dentífricos blanqueadores de dientes y productos para la piel. Además, la papaína se puede utilizar para reducir el nivel de alergenicidad de los aislados de proteína de soja, al tiempo que se pueden mejorar las propiedades sensoriales, técnicas y funcionales (18).

### **I.2.2.3 Enzimas cisteínicas de *Pseudananas macrodontes* (Pm)**

*Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms es conocida en nuestro país como “ihvirá” o “falso ananá” y sus frutos son semejantes a los del ananá, pero de menor tamaño y fibrosos (Figura I.6.). El nombre indígena “ihvirá” significa, precisamente, “fibra”. La especie se extiende desde Brasil (Minas Geraes, Rio de Janeiro, São Paulo), siguiendo por la cuenca entre los ríos Paraná y Paraguay hasta Argentina (Formosa, Chaco, Santa Fe, Misiones y Corrientes).



Figura I.6. Fruto maduro de *P. macrodontes*

Las enzimas proteolíticas presentes en los frutos de *P. macrodonte* son de tipo cisteínico, pertenecen a la familia de la papaína y han sido ampliamente estudiadas en el Centro de Investigación en Proteínas Vegetales (CIPROVE), UNLP-CIC. Estas son activas a pH 7,0 a 10,5 y son inestables a temperaturas superiores a 45 °C (19). El comportamiento térmico de la enzima es una propiedad útil para ser utilizada en la industria alimentaria, ya que se puede inactivar fácilmente en alimentos calentándola durante 10 minutos a 75 °C.

La producción y el empleo de estas proteasas presenta varias ventajas, tienen bajo coste de aislamiento mediante procedimientos sencillos, notable estabilidad en una amplia gama de condiciones de operación (temperatura, pH, salinidad y disolventes orgánicos), afinidad con una amplia variedad de sustratos y posibilidad de inmovilización lo que permite su uso en diferentes campos como la industria farmacéutica, la industria alimentaria y la valorización de residuos industriales y su conversión en productos de alto valor añadido (20).

En la tabla I.1 se muestran las características de los preparados proteolíticos de *Carica papaya* (21) y *Pseudananas macrodonte* (22). La preparación obtenida a partir del látex de *C. papaya* contiene una mayor cantidad de proteínas y actividad caseinolítica por mg de producto liofilizado, sin embargo, ambas preparaciones muestran actividades específicas similares, siendo el rango de pH óptimo más alcalino para la preparación enzimática de *P. macrodonte*.

Preparaciones proteolíticas	Rango de pH óptimo	Actividad caseinolítica (Ucas/mg)	Proteínas (µg/mg)	Actividad específica (Ucas/mg proteína)	Estabilidad térmica (45°C 60 min)
<i>Carica papaya</i>	5,5-8	1,1± 0.02	220 ±56	5,0	75% de actividad residual
<i>Pseudananas macrodonte</i>	7.5–10.5	0.09 ± 0.02	15 ± 4	6,0	70% de actividad residual

Tabla I.1. Rango de pH óptimo, actividad caseinolítica, concentración de proteínas, actividad específica y estabilidad térmica de las preparaciones proteolíticas.

## **I.3 HIDROLIZADOS PROTEICOS**

### **I.3.1 Aspectos generales**

La elección del sustrato, la preparación proteolítica empleada, y el grado de hidrólisis de la proteína afecta las propiedades fisicoquímicas y biológicas del hidrolizado resultante.

Normalmente la elección de la fuente proteica a utilizar en el proceso de hidrólisis se realiza en función del uso final que tendrá el hidrolizado y del valor añadido conseguido con respecto al sustrato de partida (23).

### **I.3.2 Compuestos e ingredientes bioactivos**

Un compuesto bioactivo es cualquier molécula presente en los alimentos, ya sea de origen vegetal o animal, que genera un efecto en el organismo que lo consume. Por otro lado, un ingrediente bioactivo se refiere a un compuesto que, al ser incorporado a un alimento, produce un impacto positivo en la salud. La principal diferencia entre ambos conceptos es que un compuesto bioactivo se encuentra en los alimentos como una sustancia simple con actividad biológica. En cambio, un ingrediente bioactivo es un compuesto bioactivo que ha sido aislado de su fuente natural y agregado a una matriz alimentaria funcional diferente, manteniendo sus propiedades incluso después de la extracción. Entre los ingredientes bioactivos se encuentran los prebióticos, probióticos, aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos grasos omega-3, lípidos estructurados, fitoquímicos, minerales, vitaminas, fibra, carbohidratos, carotenoides y compuestos fenólicos. Estas fuentes naturales poseen un gran potencial para ser usados en alimentos debido a sus efectos beneficiosos para la salud (24).

### **I.3.3 Péptidos bioactivos**

Los péptidos bioactivos forman un grupo significativo de fragmentos de proteínas de bajo peso molecular (normalmente compuesto por 2 a 20 residuos de aminoácidos) derivados de una amplia gama de alimentos, incluidos frijoles, vegetales, carnes, productos lácteos, huevos, mariscos y algas. Estas secuencias peptídicas existen inactivas dentro de la estructura de las proteínas originales hasta que se escinden y se liberan. También pueden ser producidos activamente por microorganismos (25).

Los péptidos bioactivos pueden ingresar a la célula donde llevan a cabo sus funciones biológicas, pueden ejercer diversas funciones, incluidas propiedades antihipertensivas, antiinflamatorias, anticancerígenas, antimicrobianas, inmunomoduladoras y antioxidantes.

Estos atributos han despertado interés en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética debido a su multifuncionalidad y excelente biocompatibilidad (26).

#### **I.3.4 Propiedades antioxidantes**

Los antioxidantes provenientes de la dieta son importantes debido a que captan radicales libres o inhiben/activan ciertas enzimas pro/antioxidativas.

Los péptidos antioxidantes pueden emplearse para prevenir reacciones de oxidación (como la peroxidación lipídica) que conducen al deterioro de alimentos y productos alimenticios, además las actividades antioxidantes podrían proteger los sistemas biológicos contra el daño relacionado con el estrés oxidativo en enfermedades humanas actuando directamente como depuradores de radicales libres o podrían activar vías de señalización específicas (27).

#### **I.3.5 Propiedades antimicrobianas**

Dada la creciente resistencia bacteriana a los antibióticos tradicionales, el interés en los péptidos antimicrobianos como alternativa terapéutica ha aumentado. Por esto, es esencial conocer sus estructuras para comprender el mecanismo de acción de los péptidos y su selectividad hacia los microorganismos. Los péptidos antimicrobianos abarcan una amplia variedad de motivos estructurales incluyendo péptidos lineales que forman hélices anfipáticas e hidrófobas, péptidos cíclicos y pequeñas proteínas que forman estructuras en láminas, péptidos con composiciones de aminoácidos únicas (como el triptófano y la histidina), péptidos cíclicos con grupos tioéter en el anillo, lipopéptidos que terminan en un aminoalcohol y péptidos anudados macrocíclicos. A pesar de la diversidad estructural, una característica común de los péptidos antimicrobianos es que son catiónicos y tienen una estructura anfipática que les permite unirse a la interfaz de la membrana bacteriana.

En las bacterias Gram-negativas, tanto la hoja externa de la membrana plasmática como la membrana externa contienen moléculas aniónicas orientadas hacia el exterior de la célula. Este no es el caso de las membranas de los mamíferos. Por lo tanto, los péptidos antimicrobianos catiónicos se unirán preferentemente a las cargas negativas expuestas de las membranas bacterianas, pero no a los anfifilos zwitteriónicos presentes en la monocapa extracelular de las membranas plasmáticas de los mamíferos. Con respecto al mecanismo por el cual el péptido rompe la barrera de permeabilidad de la membrana, es posible que el péptido induzca la lisis completa del organismo mediante la ruptura de la membrana o que perturbe la bicapa lipídica de la membrana, lo que permite la fuga de ciertos componentes celulares, así como la disipación

del potencial eléctrico de la membrana. Alternativamente, una propiedad necesaria pero no suficiente de estos péptidos puede ser la capacidad de atravesar la membrana para alcanzar un objetivo dentro de la célula. La interacción de estos péptidos con las membranas biológicas no es solo una función del péptido, sino que también está modulada por los componentes lipídicos de la membrana. No es probable que este grupo diverso de péptidos tenga un único mecanismo de acción, pero la interacción de los péptidos con las membranas es un requisito importante para la mayoría, si no todos, los péptidos antimicrobianos (28).

## **II. OBJETIVOS**

### **II.1 OBJETIVO GENERAL**

Con la perspectiva de aprovechar y valorizar residuos proteicos se plantea como objetivo general evaluar el uso de preparados enzimáticos de origen vegetal para obtener hidrolizados proteicos conteniendo péptidos bioactivos a partir de proteínas recuperadas desde desechos de la industria aceitera.

### **II.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1-Obtener y caracterizar las preparaciones proteolíticas vegetales
- 2-Recuperar proteínas a partir de residuos de la industria aceitera
- 3-Optimizar las condiciones de reacción para la obtención de hidrolizados enzimáticos a partir de residuos ricos en proteínas
- 4-Characterizar los hidrolizados obtenidos a través de la determinación del grado de hidrólisis y el perfil peptídico
- 5-Evaluar actividad antioxidante y antibacteriana de los hidrolizados

## III. MATERIALES Y MÉTODOS

### III.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DE PREPARADOS PROTEOLÍTICOS

Se emplearon preparaciones proteolíticas de origen vegetal obtenidas a partir de frutos de *Pseudananas macrodontes* Harms. y del látex de *Carica papaya* L.

#### III.1.1 Obtención del extracto proteolítico de *Carica papaya* (Cp)

El látex proveniente de frutos inmaduros de plantas de *C. papaya* cultivadas en el NO de Argentina fue obtenido a través de incisiones superficiales, recolectado y secado bajo condiciones controladas de tiempo y temperatura. El producto crudo fue purificado parcialmente con el fin de obtener una preparación hidrosoluble con alto rendimiento. El látex seco se resuspendió (100 mg/mL) en buffer fosfato de sodio 0,1 M de pH 6,0, conteniendo EDTA 5 mM y cisteína 10 mM, se centrifugó a 16000 g durante 30 min para eliminar gomas y otros materiales insolubles y el sobrenadante fue liofilizado, constituyendo un producto refinado y soluble en agua que denominamos Cp.

#### III.1.2 Obtención del extracto proteolítico de *Pseudananas macrodontes* (Pm)

Para la obtención del extracto crudo se procesaron 50 g de frutos congelados, desprovistos de semillas y bractéolas, que fueron cortados en pequeños trozos y triturados durante 1 min en Omni-mixer (Sorval) con 250 mL de buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,0 conteniendo EDTA y cisteína, ambas en concentración 5 mM. La suspensión obtenida se filtró a través de gasa doble y luego se centrifugó a 6000 g durante 30 min para eliminar restos vegetales y otros materiales insolubles.

#### III.1.3 Obtención del extracto parcialmente purificado denominado (PER<sub>Pm</sub>)

Dado que el extracto crudo fue obtenido a partir de frutos semimaduros, que presentan habitualmente un elevado contenido de hidratos de carbono, compuestos fenólicos, proteínas, péptidos y glúcidos, se ensayó una purificación preliminar lo que permite enriquecer el extracto en proteína activa. Para lograr esta purificación se realizó una precipitación con solvente orgánico: se agregaron tres volúmenes de etanol frío (-20 °C) gota a gota y con agitación suave, manteniendo la temperatura de la mezcla a 0-4 °C, a los efectos de reducir al mínimo la desnaturalización, se dejó reposar durante 10 min y finalmente se centrifugó a 6000 g durante

30 min. De esta manera se obtuvo un precipitado que fue separado del sobrenadante, secado por aplicación de vacío y redissuelto luego en buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,0, denominándose PER<sub>Pm</sub> (29).

#### **III.1.4 Liofilización de las preparaciones proteolíticas**

Para liofilizar se utilizó el equipo Equipo Heto Drywinner con manifold de 12 bocas (canillas) siguiendo el siguiente proceso:

- 1- Se colocó 5mL de cada muestra en frasco ampolla y se congeló a -20°C
- 2- Se puso en funcionamiento el equipo de frío y se esperó a que llegue a -40°C o inferior
- 3- Se puso en funcionamiento la bomba de vacío y se esperó a que llegue a 100 micrones de Hg para luego empezar a colocar de a uno cada frasco ampolla, conteniendo la muestra congelada, en su respectiva canilla
- 4- Se dejó funcionando el equipo por 24 h o hasta que el material esté totalmente seco
- 5- Una vez terminado el proceso los frascos fueron sacados de a uno

#### **III.1.5 Medida de la actividad proteolítica**

El sustrato se preparó suspendiendo 1 g de caseína tipo Hammarsten (Research Organics) en 100 mL de solución buffer de pH óptimo para cada preparado enzimático. Luego, la suspensión se colocó en un baño de agua que se llevó a ebullición y se mantuvo durante 20 minutos en esas condiciones. La solución resultante se filtró por papel en caliente y se utilizó el mismo día en que fue preparada. Siguiendo el protocolo establecido por Errasti *et al.* (30), la caseína al 1% p/v y la preparación enzimática fueron incubadas a 35 °C y 55 °C durante 2 y 5 min, tiempos en el cual la reacción fue finalizada por la adición de ácido tricloroacético al 5% v/v. Finalmente, luego de centrifugar se determinó la absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm (Abs 280). En todos los casos fueron realizados ensayos de blanco de reacción siguiendo el mismo procedimiento pero agregando el ácido tricloroacético antes que el sustrato.

Se definió una unidad arbitraria (Unidad caseinolítica, Ucas), que corresponde a la cantidad de enzima requerida para producir un incremento de una unidad de Abs 280 al cabo de un minuto, en las condiciones de ensayo (31).

### **III.2 OBTENCIÓN DEL SUSTRATO PROTEICO**

A partir del expeller de girasol donado por la empresa COFCO INTL (que posee una planta de elaboración de aceites de girasol y soja en la localidad de Saforcada, partido de Junín), en el grupo de trabajo de la Dra. María José Torres del CIT-NOBA se obtuvo una harina desgrasada

(HDG) mediante trituración y tamizado con malla de 500  $\mu$  para eliminar parcialmente las fibras y enriquecer en proteínas. Luego, se optimizó la obtención de un concentrado proteico de girasol (CPG) mediante lavados sucesivos de la HDG con solución de etanol 70% - HCl (pH 5,0) en baño de ultrasonido a 25°C (32). El producto final contuvo 50,7% p/p de proteínas en base seca.

### **III.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA**

El CPG fue hidrolizado empleando Cp y Pm en condiciones de pH y temperatura óptimas para cada preparado enzimático.

#### **III.3.1 Obtención de los hidrolizados**

Las proteínas contenidas en el CPG se hidrolizaron con los preparados proteolíticos mediante una relación enzima/sustrato del 5 % (g preparado/100 g CPG) empleando buffer fosfato sódico 0,1 M de pH 6,5 para la Cp y de pH 8 para Pm. Las reacciones fueron llevadas a cabo en baño termostático a 45°C bajo agitación orbital de 100 rpm. Se ensayaron diferentes tiempos finales de reacción (0, 5, 10, 30, 60 y 120 min). En cada caso la hidrólisis se detuvo por calentamiento a baño maría durante 10 min. En simultáneo se realizó un control para cada una de las condiciones de hidrólisis detalladas anteriormente, pero empleando la enzima inactivada térmicamente (10 min a 100°C previo al ensayo).

La alícuotas obtenidas a distintos tiempos fueron centrifugadas durante 15 min a 7000 g y los sobrenadantes fueron conservados a -20°C hasta su uso.

#### **III.3.2 Determinación de la concentración de proteínas solubles**

Se utilizó el método de Bradford que se basa en la formación de un complejo de coloración azul entre los residuos de aminoácidos de las proteínas y el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB). El CBB existe bajo dos formas coloreadas, una forma protonada de color naranja-rojo pálido con absorbancia a 465 nm y la otra azul con absorbancia a 595 nm. Este colorante se une fuertemente a proteínas interactuando tanto con los grupos cargados positivamente de las mismas como con sus grupos hidrofóbicos. En este entorno de grupos cargados positivamente, la protonación del colorante es suprimida, apareciendo un color azul que absorbe a 595 nm, y que exhibe un alto coeficiente de extinción, lo que le da una alta sensibilidad a la medida (33).

Se utilizó el macrométodo, para lo cual se tomaron 50  $\mu$ L de muestra y 2,5 mL de reactivo, se agitó en vórtex y se leyó la absorbancia a 595 nm a los 10 min. Para la curva de calibración se

usaron las siguientes concentraciones de albúmina ( $\mu\text{g/mL}$ ): 1000, 667, 444, 296, 198, 132, 88. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

### III.3.3 Determinación del grado de hidrólisis (GH)

El o-ftaldehído (OPA) reacciona con los grupos aminos primarios de los aminoácidos en presencia de un compuesto reductor (ditiotreitól, DTT). Como producto de reacción se genera un compuesto coloreado detectable a una longitud de onda de 340 nm. Esta medida de absorbancia permite cuantificar los grupos aminos libres generados durante la hidrólisis y calcular el GH. Es un método rápido y simple (34).

Para el cálculo del GH se utilizó la siguiente fórmula:

- Cálculo de %GH:  $GH \% = 100 \times (NH_{2t} - NH_{2t=0}) / (NH_{2\infty} - NH_{2t=0})$

Donde: el contenido de  $NH_{2t}$  y  $NH_{20}$  se determinan a partir de la curva patrón al tiempo "t" y "0"

$$NH_{2\infty} = (1/PM_{\text{promedio de aa}}) \times (1 + f_{Lys}) \times \text{prot (g/L)} \times 1000$$

$$PM_{\text{promedio de aa}} = 130\text{g/mol}$$

$$f_{Lys} = 1/25 \text{ (para girasol)}$$

1000 (viene de transformar moles en milimoles = miliequivalentes)

### III.3.4 Análisis electroforético (Tricina-SDS-PAGE)

Se empleó el sistema electroforético con tricina por ser muy adecuado para la separación de polipéptidos y proteínas en el rango de 5 a 100 kDa (Shägger, 2006). La tricina es utilizada como ión de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas a menores concentraciones de acrilamida que en el caso del clásico buffer Tris-glicina (35).

**Preparación de las Muestras.** Las alícuotas fueron tratadas con el buffer de muestra para electroforesis (Tabla III.1) y se llevaron a ebullición durante 5 min, luego de lo cual se centrifugaron por 5 min a 10000 g.

<b>Buffer de muestra</b>	
<b>Tris</b>	1,57 g
<b>SDS</b>	2 g
<b>Mercaptoetanol</b>	5 mL
<b>Glicerol</b>	8 mL
<b>Azul de bromofenol</b>	2 mg
<i>Llevar a pH 6,8 con HCl 1 M</i>	
<b>AD (AD), c.s.p.</b>	100 mL

Tabla III.1. Buffer de muestra para electroforesis

Para la preparación de los geles se utilizaron los reactivos descritos en las Tabla III.2 y III.3. Los geles se moldearon con el equipo Mini-Protean III, Bio-Rad, empleando el soporte provisto a tal efecto.

<b>Reactivos</b>	<b>Gel de Stacking (5%)</b>	<b>Gel de Resolución (14%)</b>
<b>Acril-Bis (30:0,8)</b>	1,32 mL	6,4 mL
<b>Buffer del gel</b>	2,48 mL	4 mL
<b>AD</b>	6,2 mL	0,4 mL
<b>Persulfato de Na 10%</b>	120 µL	100 µL
<b>TEMED</b>	12 µL	10 µL

Tabla III.2. Reactivos de los geles de electroforesis

<b>Buffer del gel</b>	
<b>TRIS</b>	36,3 g
<b>SDS</b>	0,3 g
<b>AD, c.s.p.</b>	100 mL

Tabla III.3. Buffer para la preparación del gel de electroforesis

**Aplicación de las Muestras y Condiciones de Corrida.** Se aplicaron 5 µl de muestra en cada una de las calles y en los reservorios anódico y catódico se colocaron los correspondientes sistemas buffer (Tabla III.4 y III.5).

<b>Buffer Catódico</b>	
<b>Tris</b>	12,1 g
<b>Tricina</b>	17,9 g
<b>SDS</b>	1 g
<b>AD, c.s.p</b>	1000 mL

Tabla III.4. Buffer catódico

<i>Buffer Anódico</i>	
<b>Tris</b>	24,2 g
<b>HCl 1 M, c.s.p</b>	pH 8,9
<b>AD, c.s.p</b>	1000 mL

Tabla III.5. Buffer anódico

Las corridas se realizaron a voltaje constante (40 V) durante el apilado, luego se aumentó lentamente hasta 150 V, valor que se mantuvo constante hasta la finalización de la electroforesis.

**Tinción con Coomassie Brilliant Blue G-250.** Finalizada la corrida electroforética, los geles fueron fijados en solución fijadora (Tabla III.6) durante 30 min y teñidos por inmersión en solución colorante (Tabla III.7) durante toda la noche. Posteriormente se hicieron sucesivos lavados con agua destilada para eliminar la coloración de fondo (Tabla III.8). Esta coloración tiene una sensibilidad de 0,2 a 0,5 µg por banda.

Solución fijadora	
Ácido acético glacial	100 mL
Metanol	400 mL
AD, c.s.p	500 mL

Tabla III.6. Solución fijadora de la electroforesis

Solución colorante	
Ácido acético glacial	100 mL
Coomassie brilliant blue R-250	250 mg
AD, c.s.p	900 mL

Tabla III.7. Solución colorante

Solución decolorante	
Ácido acético glacial	100 mL
<b>AD, c.s.p</b>	900 mL

Tabla III.8. Solución decolorante

Para la determinación de los pesos moleculares (PM) de las distintas especies proteicas se utilizaron como proteínas estándar una mezcla de proteínas patrones de bajo peso molecular (14.3 kDa, 20.1 kDa, 30 kDa, 45 kDa, 66 kDa y 97 kDa, Low Protein Markers, GE Healthcare).

### **III.3.5 Determinación de actividad antioxidante**

Se utilizó el radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Éste radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante.

La reacción puede seguirse midiendo la disminución de la absorbancia a 515 nm, dado que el DPPH posee un espectro de absorbancia característico con un máximo de absorción a dicha longitud de onda, pero su reducción provocada por un radical o un antioxidante implica una disminución en su absorbancia a 515 nm.

Se preparó el reactivo pesando 0,0039 g de DPPH que se disolvió en 100 mL de etanol 96% agitando en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min.

Para determinar la actividad antioxidante se utilizaron 50 uL de muestra y 1,45 mL de DPPH para alcanzar un volumen final de 1,5 mL se centrifugo durante 10 min a 2500 g y se determinó la absorbancia a 515 nm (36). Se calculó la capacidad de inhibición (%I) de acuerdo a la fórmula:

$\%I = (A - B/A) * 100$  donde A es la absorbancia del reactivo a 515 nm y B la absorbancia de la mezcla de reacción a la misma longitud de onda.

### **III.3.6 Actividad antimicrobiana**

Se evaluaron los hidrolizados con 3 cepas de referencia: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Cada placa contuvo la cepa de referencia con un disco de amikacina como control interno y la evaluación de las muestras.

Las muestras de hidrolizados se suspendieron en 50 uL de agua y se sembraron 15uL en cada pocillo (3 pocillos evaluados, 1 por cepa).

### **III.3.7 Análisis estadístico**

Cuando fue necesario analizar la significancia de las diferencias entre los datos se realizó un análisis estadístico por análisis de varianza (ANOVA) de una vía, empleando los test de Dunnett mediante el programa GraphPad Prism 10.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

### IV.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS PREPARADOS PROTEOLÍTICOS

#### IV.1.1 Actividad proteolítica

Con el propósito de conocer la actividad enzimática de los extractos se determinó la actividad caseinolítica. Para la reacción, llevada a cabo en condiciones de concentración de sustrato saturante, se buscó establecer el período de tiempo en que se podía medir la velocidad inicial. La actividad mostró un comportamiento característico en función de la proteasa, la temperatura y el tiempo de reacción.

En las figuras IV.1 y IV.2 se representa la absorbancia a 280 nm en función del tiempo del ensayo para dos temperaturas para Cp y Pm, respectivamente.

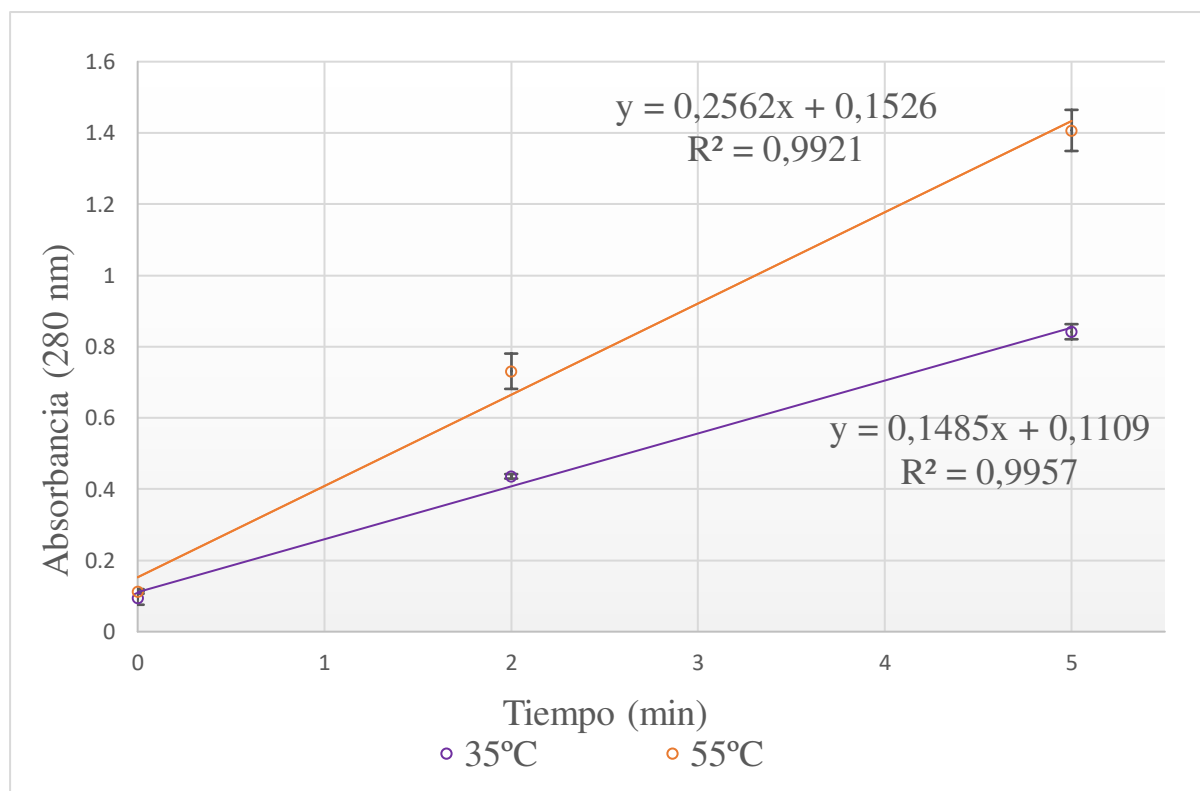


Figura IV.1. Absorbancia a 280 nm en función del tiempo para dos temperaturas de reacción con el preparado enzimático Cp. Se representa la ecuación de la recta y su  $R^2$  para cada temperatura. Los valores se muestran como la media  $\pm$  DE (n=3).

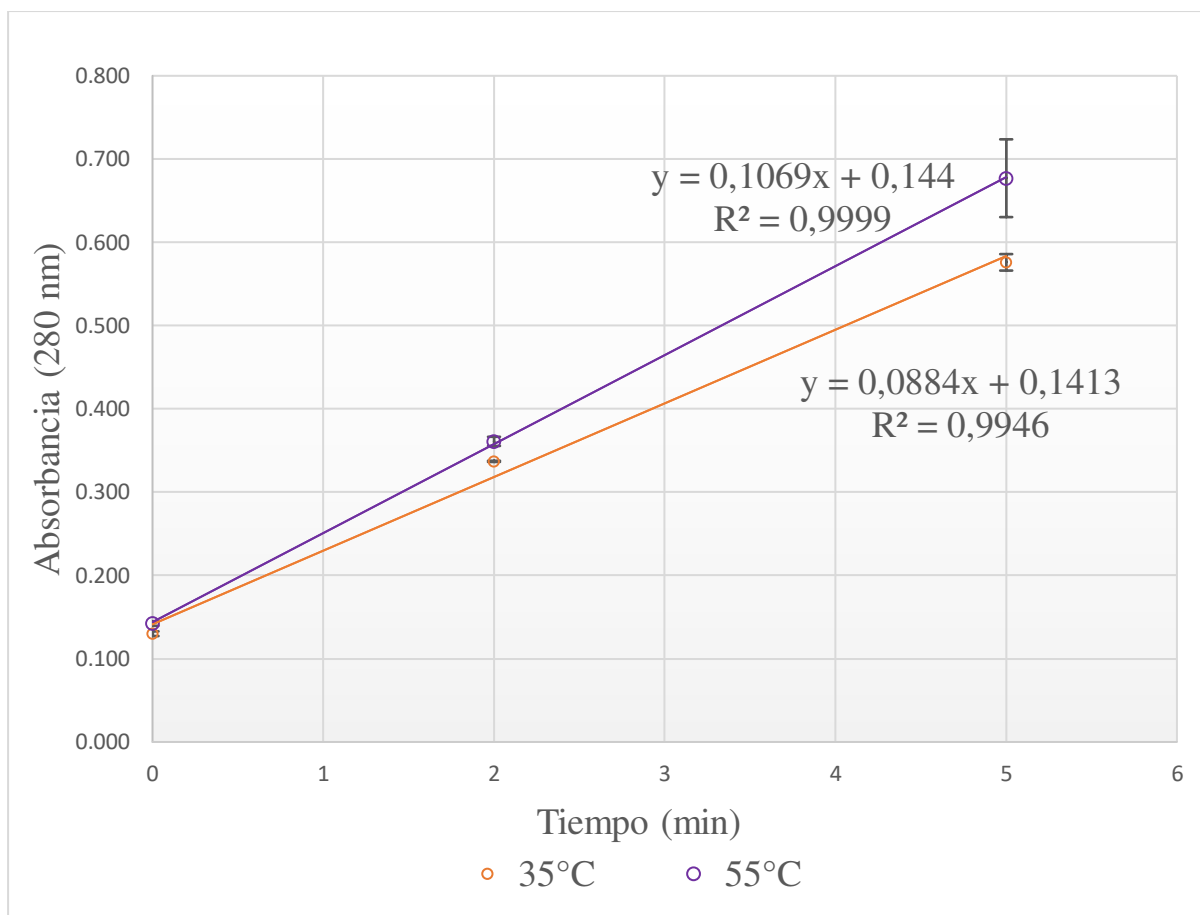


Figura IV.2. Absorbancia a 280 nm en función del tiempo para dos temperaturas de reacción con el preparado enzimático Pm. Se representa la ecuación de la recta y su  $R^2$  para cada temperatura. Los valores se muestran como la media  $\pm$  DE (n=3).

De los gráficos se puede concluir que de 0 a 5 minutos las reacciones enzimáticas presentaron un comportamiento lineal ya que sus  $R^2$  son mayores a 0,99; constatando así que la  $V$  inicial es igual a la  $V$  máx con las concentraciones de sustrato y de enzima usados y en las condiciones de pH y temperatura ensayadas.

Usando los valores obtenidos a los 2min de reacción se determinaron los valores de actividad caseinolítica (Tabla IV.1) por mg de muestra liofilizada ensayados a dos temperaturas (35°C y 55°C).

Tabla IV.1. Actividad caseinolítica (Ucas) por mg de muestra liofilizada de los preparados enzimáticos.

Preparado enzimático	Temperatura (°C)	Actividad caseinolítica (Ucas/mg liofilizado)
<b>Cp</b>	<b>35</b>	<b>0,51 ± 0,01</b>
	<b>55</b>	<b>1,30 ± 0,09</b>
<b>Pm</b>	<b>35</b>	<b>0,160 ± 0,008</b>
	<b>55</b>	<b>0,514 ± 0,008</b>
<b>PER<sub>Pm</sub></b>	<b>35</b>	<b>0,102 ± 0,002</b>
	<b>55</b>	<b>0,230 ± 0,001</b>

Los valores se muestran como la media ± DE (n=3).

Comparando la información de la Tabla IV.1 se observa que para cada preparado, la actividad caseinolítica aumentó alrededor de tres veces cuando se aumentó la temperatura de 35°C a 55°C.

Por otro lado, Cp presentó aproximadamente 5 veces más actividad que Pm para cada temperatura ensayada.

Se observa también que al realizar la purificación parcial de Pm (PER<sub>Pm</sub>) la actividad enzimática disminuyó, esto es probablemente debido a los pasos de precipitación y resuspensión en los cuales pudo haber ocurrido desnaturalización y la consecuente pérdida de la actividad enzimática. Para los siguientes ensayos se decidió emplear el Pm en vez de PER<sub>Pm</sub>.

#### **IV.1.2 Determinación de la concentración de proteínas**

Se construyó una curva de calibración con seroalbúmina bovina como proteína patrón para establecer la concentración de proteínas solubles en los preparados enzimáticos (Figura IV.3).

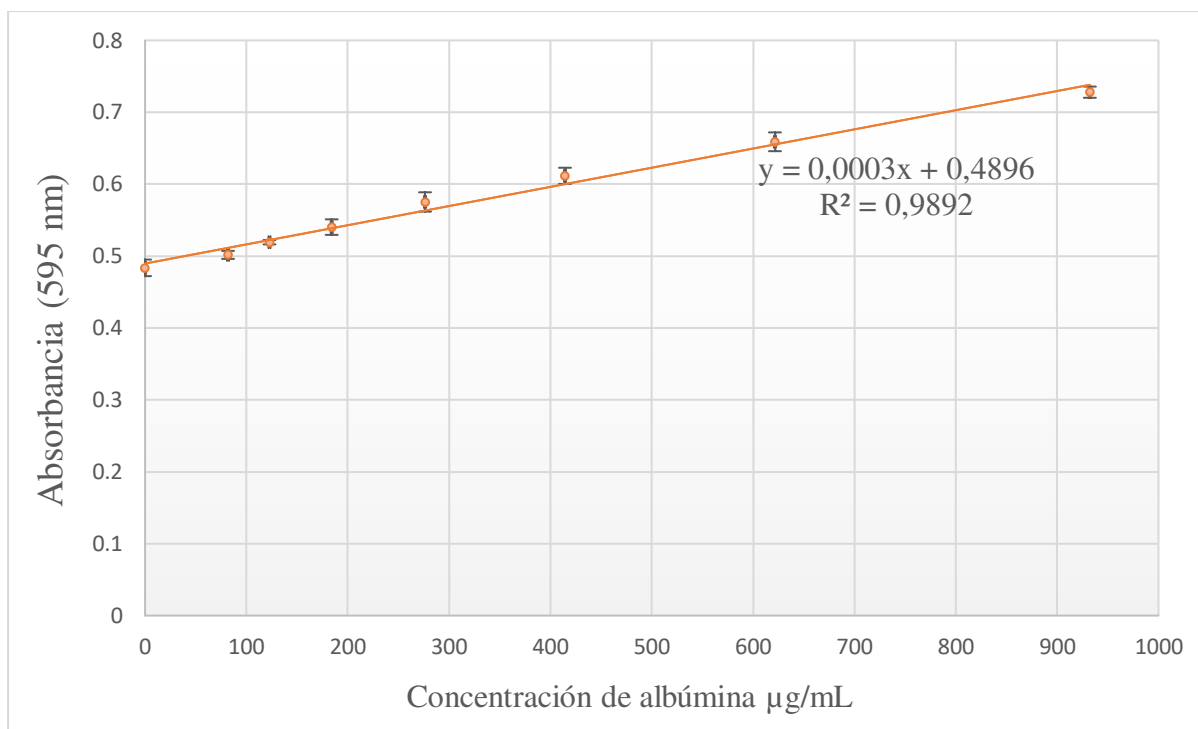


Figura IV.3. Curva de calibración para determinar proteínas por el método de Bradford. Absorbancia en función de la concentración de seroalbúmina bovina. Se representa la ecuación de la recta y su  $R^2$ . Los valores se muestran como la media  $\pm$  DE (n=3).

Del gráfico se comprueba que existe linealidad entre las concentraciones ensayadas ( $R^2 = 0,9892$ ). Con estos valores y los de la actividad enzimática de la Tabla IV.1 se pudieron calcular las actividades específicas (Ucas/mg de proteína) de los preparados enzimáticos (Tabla IV.2).

Tabla IV.2. Actividades específicas de los preparados proteolíticos de Cp y Pm y concentración de proteínas. Media  $\pm$  DE.

Preparado enzimático	$\mu\text{g}$ proteína/mg liofilizado	Actividad específica (Ucas/mg de proteína)
<b>Cp</b>	<b>86 <math>\pm</math> 13</b>	<b>5,8 <math>\pm</math> 0,9</b>
<b>Pm</b>	<b>19 <math>\pm</math> 4</b>	<b>5,3 <math>\pm</math> 1,1</b>

Los valores se muestran como la media  $\pm$  DE (n=3)

Si bien las actividades específicas son similares para Cp y Pm, la concentración de proteínas por mg de liofilizado es notablemente mayor para Cp.

Los resultados obtenidos de la actividad específica y los  $\mu\text{g}$  proteína/mg liofilizado de los preparados de Cp y Pm son los esperados si se los compara con los de la bibliografía citada (Tabla I.1).

## IV.2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS

### IV.2.1. Determinación de la concentración de proteínas solubles

Se construyó una curva de calibración con seroalbúmina bovina como proteína patrón (Figura IV.4).

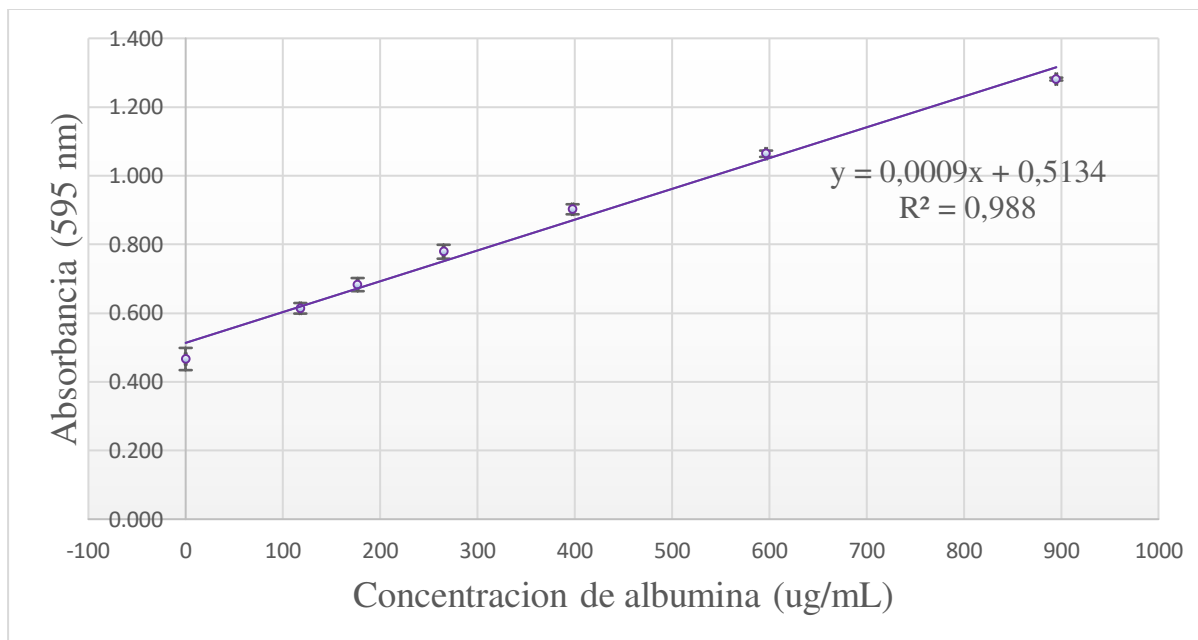


Figura IV.4. Curva de calibración de Bradford. Absorbancia en función de la concentración de seroalbúmina bovina. Se representa la ecuación de la recta y su  $R^2$ . Los valores se muestran como la media  $\pm$  DE (n=3).

Del gráfico de la Figura IV.4 se comprueba que existe linealidad entre las concentraciones ensayadas ( $R^2=0,988$ ), por lo que se usó dicha curva de calibración para calcular las concentraciones de proteínas solubles del CPG y los hidrolizados de CPG obtenidos a distintos tiempos con los preparados proteicos Cp (Figura IV.5) y Pm (Figura IV.6).

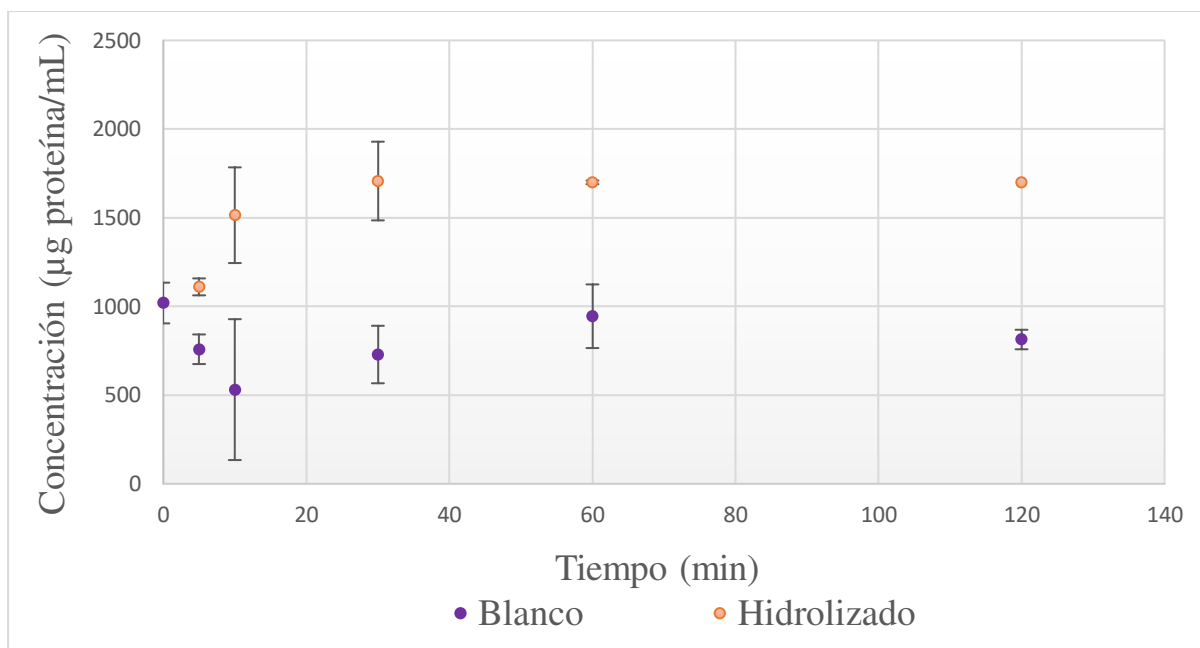


Figura IV.5. Concentración de proteínas en función del tiempo de hidrólisis con Cp. Los valores se muestran como la media  $\pm$  DE (n=3).

Del gráfico de la Figura IV.5 se observa que si bien CPG posee una solubilidad inicial de alrededor de 1000  $\mu\text{g}$  proteínas/m , luego de la incubación con Cp la solubilidad aumenta progresivamente hasta alcanzar a los 30 min valores de alrededor de 1800  $\mu\text{g}$  proteínas/mL que se mantienen constantes a lo largo de las 2h de incubación. El aumento de solubilidad se puede atribuir a la degradación enzimática porque el blanco de reacción (Blanco) no muestra un aumento de solubilidad con el tiempo.

En el gráfico de la Figura IV.6 se observa que CPG posee una solubilidad inicial de alrededor de 900  $\mu\text{g}$  proteínas/mL y luego de la incubación con Pm la solubilidad aumenta alcanzando valores de alrededor de 1800  $\mu\text{g}$  proteínas/mL que se mantienen constantes a partir de los 30 min de incubación.

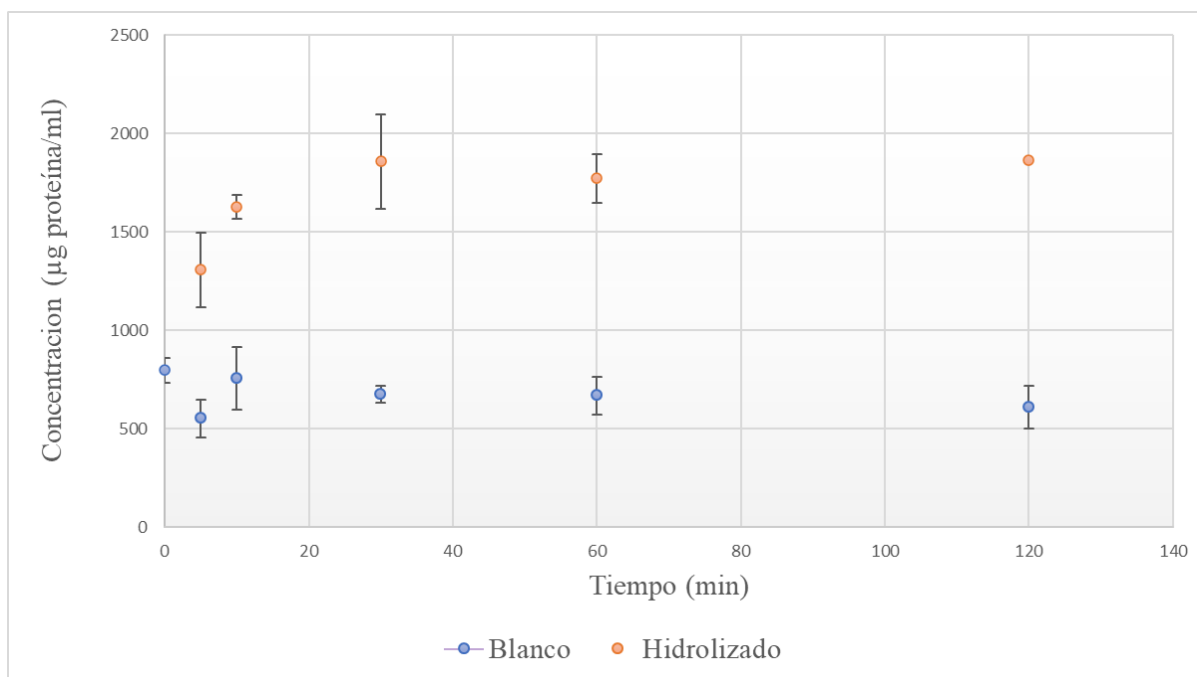


Figura IV.6. Concentración de proteínas en función del tiempo de hidrólisis con Pm. Los valores se muestran como la media  $\pm$  DE (n=3).

El aumento de solubilidad nuevamente puede ser atribuido a la degradación enzimática porque el blanco de reacción no muestra un aumento de solubilidad con el tiempo.

Al comparar las solubilidades entre los hidrolizados obtenidos con Cp y Pm se puede decir que en ambos preparados enzimáticos muestran el mismo efecto sobre el CPG.

#### IV.2.2. Determinación del grado de hidrólisis (GH)

El avance de la reacción de hidrólisis se determina comúnmente con el GH, que representa la proporción de enlaces peptídicos escindidos en los enlaces peptídicos de la proteína expresados en porcentaje.

En la Figura IV.7 se muestra el GH de los hidrolizados de CPG con los preparados enzimáticos Cp y Pm, usando el método de medición de aminos libres por OPA (ver sección III.3.3).

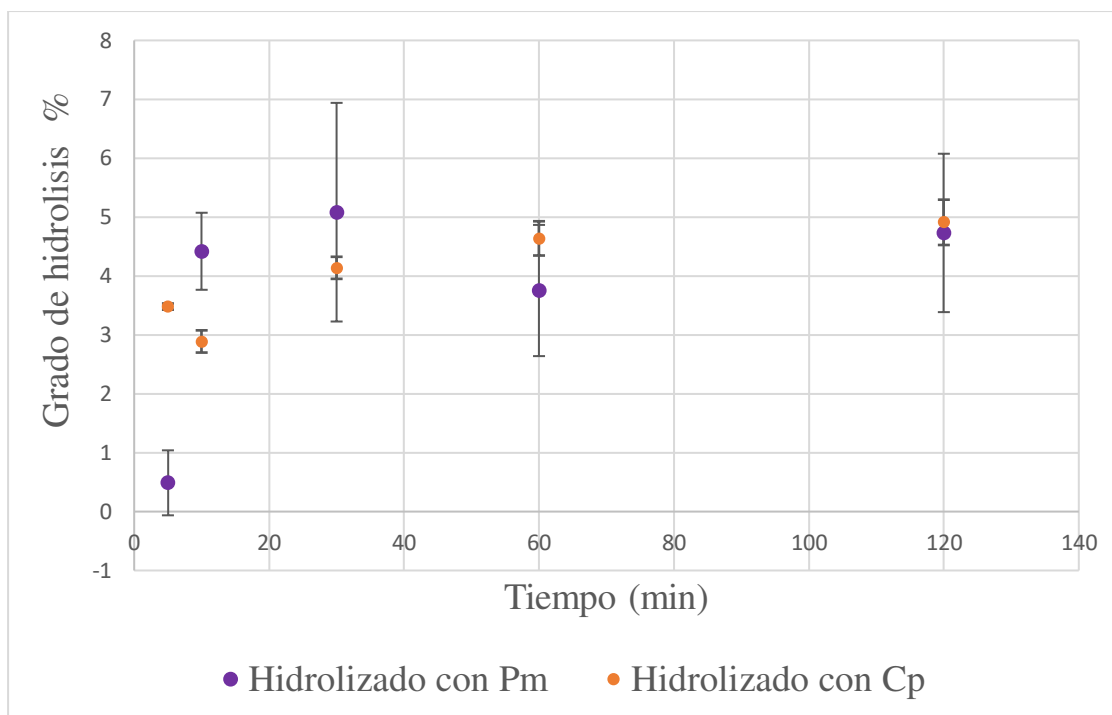


Figura IV.7. Seguimiento de la reacción mediante la medición de grupos amino libres por OPA. Los valores se muestran como la media  $\pm$  DE (n=3).

Como se puede observar en el gráfico de la Figura IV.7, a medida que transcurre el tiempo de reacción el GH aumenta al inicio (entre los 10 y 30 min), siendo dicho incremento más pronunciado para Pm, luego de lo cual se mantiene en valores constantes de alrededor de 5%.

Según trabajos realizados con aislados de proteínas de girasol (37) el GH estaría relacionado con la solubilidad. El aumento del valor del GH mejoraría la solubilidad de proteínas vegetales que fueron previamente sometidas a hidrólisis enzimática. La mayor solubilidad de los hidrolizados en comparación con la de las proteínas iniciales se explicaría principalmente por la liberación de grupos funcionales polares a partir de la escisión de los enlaces peptídicos, esto está asociado con una modificación de la estructura de la proteína y la exposición al solvente acuoso de grupos funcionales polares inicialmente ocultos en la proteína nativa. Se ha reportado que la hidrólisis mejora significativamente la solubilidad aún para GH bajos y de manera independiente de la proteasa aplicada, se consigna que la solubilidad aumentó el doble para valores de GH bajo. Los hidrolizados obtenidos con enzimas comerciales: Alcalasa GH 8%, 10% y 12%, y con Prolyve GH 12%, fueron casi totalmente solubles a pH 6,0, lo que es prometedor para su uso potencial en muchas aplicaciones alimentarias (38).

### IV.2.3 Análisis electroforético (tricina-SDS-PAGE)

En la Figura IV.8 se muestran los perfiles electroforéticos para los diferentes tiempos de hidrólisis con Cp.

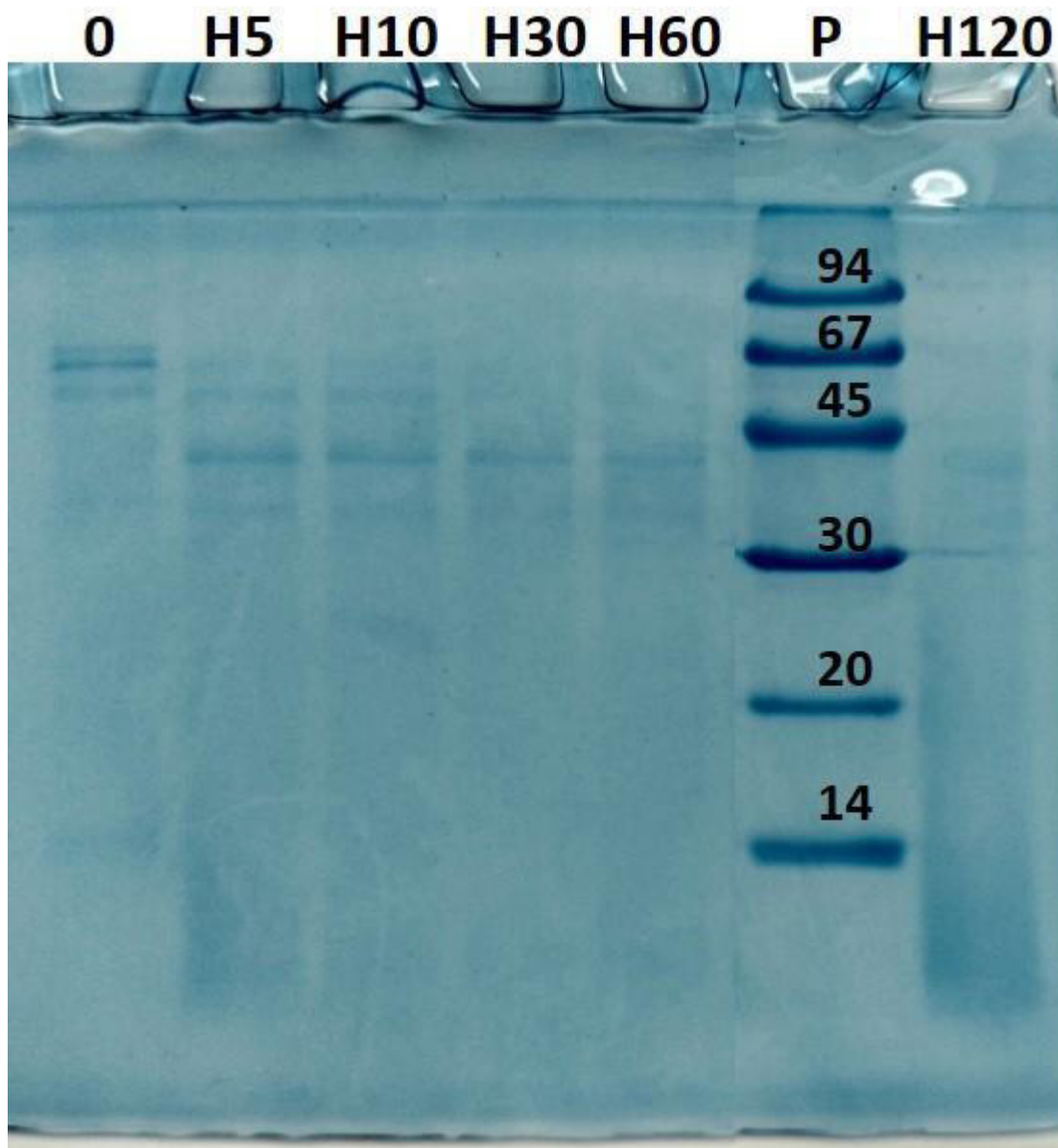


Figura IV.8. Electroforesis tricina-SDS-PAGE de la reacción de hidrólisis de Cp. 0: control, CPG sin hidrolizar. H0, H5, H10, H30, H60 y H120: corresponden a los tiempos de hidrólisis de 5, 15, 30, 60 y 120 min, respectivamente. P: Patrones de peso molecular.

En los hidrolizados se puede apreciar una notable degradación de las bandas cercanas al patrón de 67 kDa que están presentes en el blanco de reacción (CPG sin hidrolizar), mientras que

aparece una banda notoria cercana a los 45 kDa y otras de menor peso molecular, evidenciando que hubo una notoria hidrólisis de las proteínas del CPG.

#### IV.2.3. Determinación de actividad antioxidante

En las Figuras IV.9 y IV.10 se representan las actividades antioxidantes de los hidrolizados obtenidos con Cp y Pm en comparación con sus respectivos blancos de reacción (Blanco).

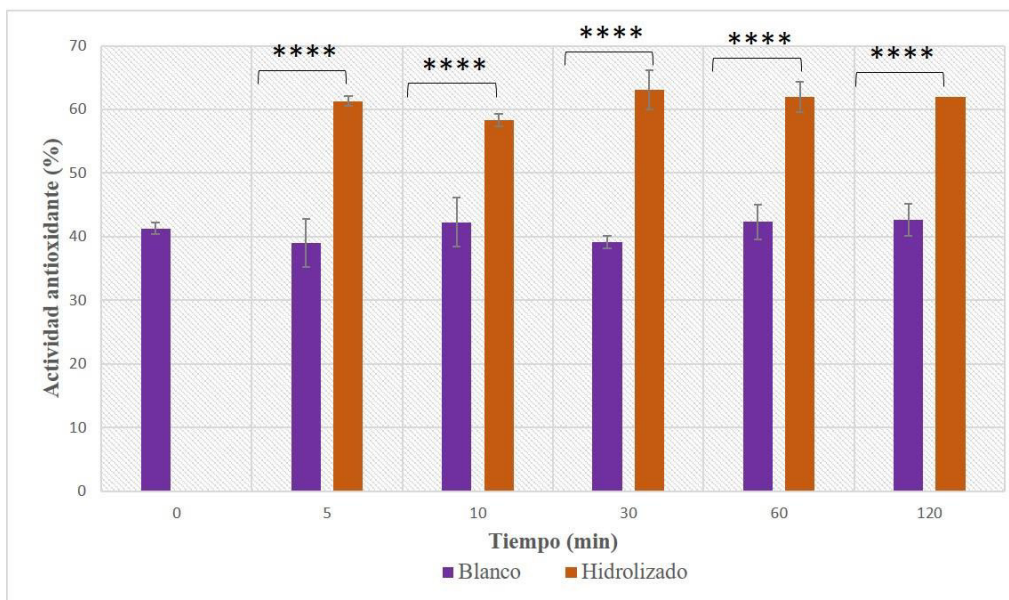


Figura IV.9. Actividad antioxidante del hidrolizado obtenido con Cp. Los valores se muestran como la media  $\pm$  DE (n=3). Test de Dunnett: \*\*\*\*p < 0,0001.

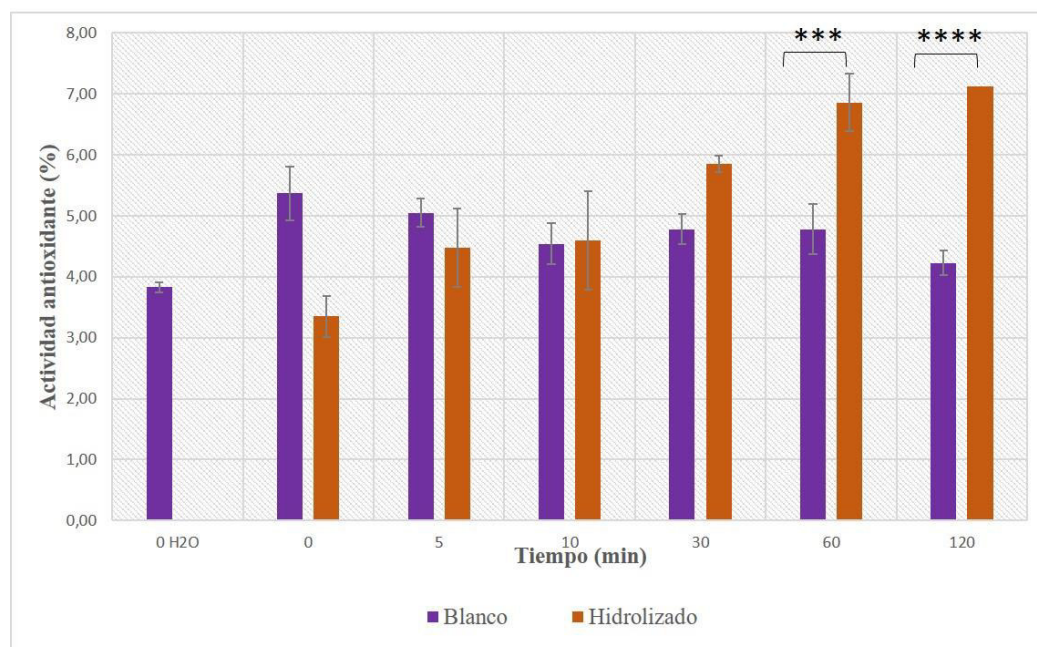


Figura IV.10 Actividad antioxidante del hidrolizado con Pm. Los valores se muestran como la media  $\pm$  DE (n=3). Test de Dunnett: \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

Los resultados de los gráficos muestran que en ambos hidrolizados se obtuvo actividad antioxidante pero los hidrolizados obtenidos con Cp presentan valores muy superiores con respecto a los hidrolizados obtenidos con Pm. Además, con Cp se obtuvo actividad antioxidante desde el primer tiempo de incubación (5min) que se mantuvo constante (alrededor del 60%) hasta los 120 min, mientras que para Pm solo los tiempos de 60 y 120 min presentan actividad antioxidante significativamente diferente respecto de los blancos de reacción.

Las propiedades antioxidantes de los péptidos están relacionadas con su composición, estructura e hidrofobicidad. Los aminoácidos con residuos aromáticos por ejemplo pueden donar protones a radicales con deficiencia en electrones. Esta propiedad favorece la propiedad atrapadora de radicales de los residuos de aminoácidos. Además de la presencia de los aminoácidos adecuados, su correcta posición en la secuencia del péptido juega una función importante en la actividad antioxidante de los péptidos (40). Se ha reportado que la actividad antioxidante de los hidrolizados del gluten del maíz estaba muy relacionada con la concentración y el peso molecular de los hidrolizados y la actividad antioxidante de péptidos de entre 500-1500 Da era más elevada que la de péptidos por encima de 1500 Da (39).

#### **IV.2.4. Determinación de actividad antimicrobiana**

Debido a que la actividad antimicrobiana está asociada a péptidos de pequeño PM, se continuó la hidrólisis de los hidrolizados obtenidos con Cp y con Pm mediante la inclusión de una exopeptidasa de origen comercial (Flavourzyme) según los protocolos que se detallan a continuación:

1-Blanco de hidrolizado de 60 min con Cp, incubado luego 1h a 50°C con flavourzyme (3%) inactivada térmicamente (5min a 100°C).

2-Hidrolizado de 60min con Cp, incubado luego 1h a 50°C con flavourzyme (3%).

3-Blanco de hidrolizado de 60min con Pm, incubado luego 1h a 50°C con flavourzyme (3%) inactivada térmicamente (5min a 100°C).

4-Hidrolizado de 60min con Pm , incubado luego 1h a 50°C con flavourzyme (3%).

A estas muestras se les determinó el GH (Figura IV.11).

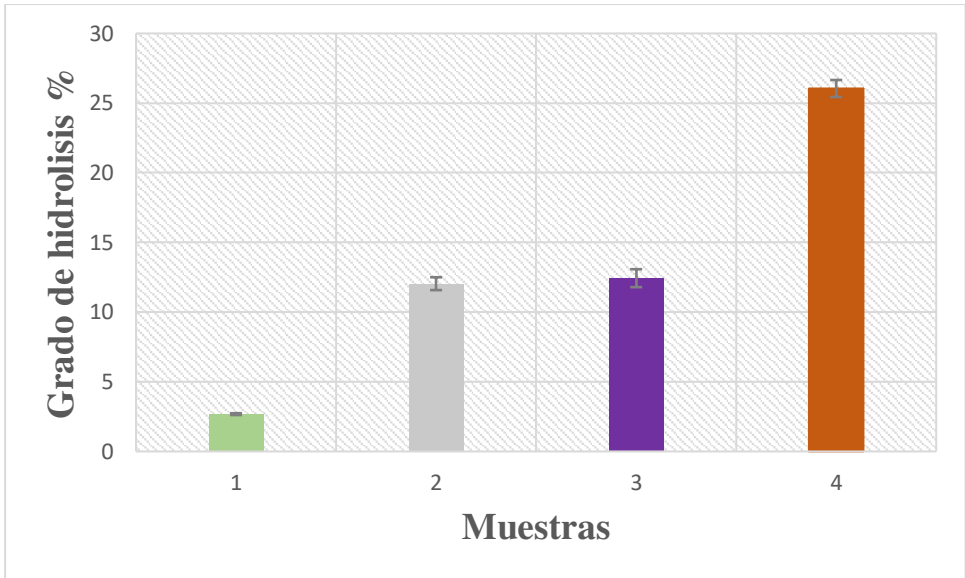


Figura IV.11. Grado de hidrólisis para los hidrolizados obtenidos por combinación de enzimas (Cp, Pm y Flavourzyme). Los valores se muestran como la media  $\pm$  DE (n=3).

Se puede observar un aumento del GH cuando los hidrolizados obtenidos con Cp y Pm fueron sometidos a un nuevo proceso enzimático (2 y 4, respectivamente), siendo en ambos casos significativamente mayores respecto de los blancos correspondientes (1 y 3, respectivamente). Esta nueva hidrólisis ayudaría a obtener diversidad y péptidos de menor PM, por lo que se decidió evaluar la posible acción antimicrobiana. Para ello se usaron 3 cepas de referencia: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

En la figura IV.12 se observan las placas de siembra con las muestras de los hidrolizados.

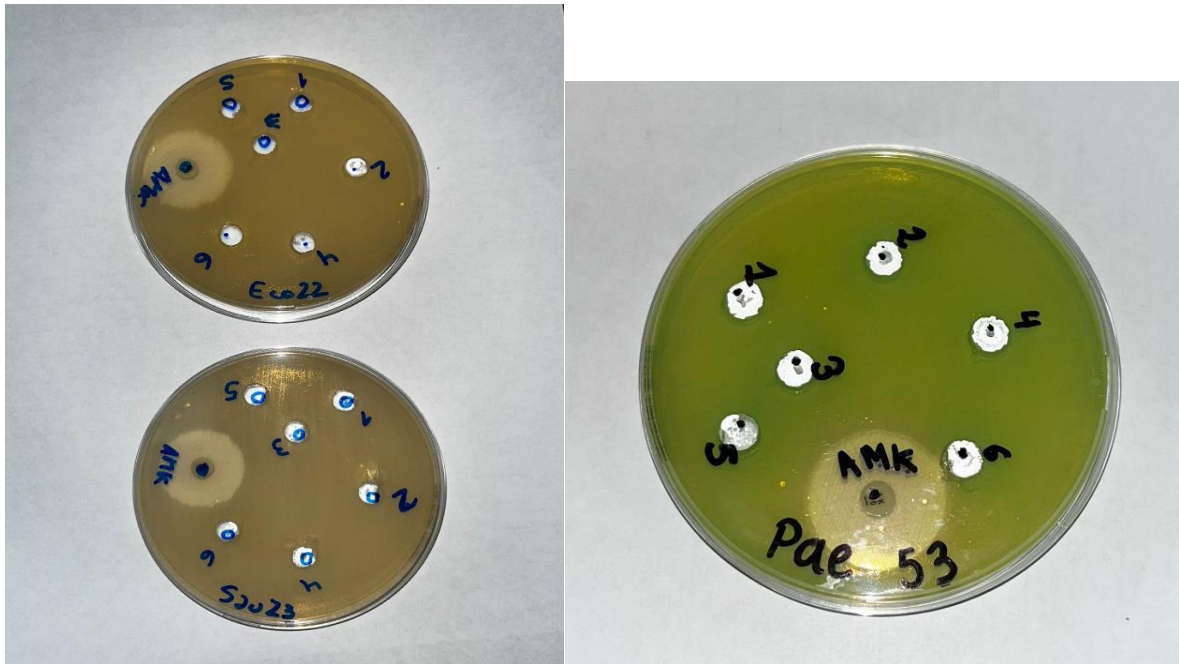


Figura IV.12. Placas de ensayo con las muestras de los hidrolizados.

Las muestras no mostraron ningún efecto inhibitorio.

Como las propiedades de los hidrolizados dependen del tipo de enzima utilizada, el grado de hidrólisis, las condiciones ambientales y el pretratamiento del sustrato es posible que al cambiar alguna de estas variables de los ensayos realizados se pueda llegar a encontrar algún hidrolizado que pueda llegar a tener actividad antimicrobiana como se vio en la bibliografía consultada.

## V. CONCLUSIONES

Preparaciones proteolíticas de origen vegetal obtenidas a partir de frutos de *C. papaya* y *P. macrodentes* fueron caracterizadas y empleadas para hidrolizar proteínas de girasol, un subproducto de la industria aceitera.

La hidrólisis del concentrado de proteínas de girasol se llevó a cabo con ambas preparaciones proteolíticas, empleando diferentes tiempos de reacción y determinado en cada caso el GH, la solubilidad y el poder antioxidante. Los GH alcanzados fueron inferiores al 5%, sin embargo se logró aumentar a más del doble la solubilidad y se detectó actividad antioxidante. Para ensayar la actividad antimicrobiana se obtuvieron hidrolizados con mayor grado de hidrólisis, pero los resultados fueron negativos para las cepas ensayadas.

A lo largo del desarrollo del trabajo final se emplearon diversas herramientas de bioquímica y equipamiento básico que forma parte de un laboratorio de investigación. De esta manera se ha logrado obtener entrenamiento y destreza para el trabajo experimental, así como en la redacción y el análisis de los resultados, empleando métodos estadísticos y bibliografía soporte adecuada.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- (1) Guiotto, E. N. (2014). *Aplicación de subproductos de chía (Salvia hispanica L.) y girasol (Helianthus annuus L.) en alimentos* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- (2) Martinefsky, C. L., Nolasco, S. M., & Riccobene, I. C. APROVECHAMIENTO ENERGÉTICO DE UN RESIDUO DE LA AGROINDUSTRIA ACEITERA.
- (3) de Oliveira Filho, J. G., & Egea, M. B. (2021). Sunflower seed byproduct and its fractions for food application: An attempt to improve the sustainability of the oil process. *Journal of Food Science*, 86(5), 1497-1510.
- (4) Vioque, J., Pedroche, J., Yust, M., Lqari, H., Megías, C., Girón-Calle, J., Alaiz, M., & Millán, M. (2006). Bioactive Peptides in Storage Plant Proteins. *Brazilian Journal of Food Technology*, 99-102.
- (5) Spellman, D., McEvoy, E., O'Cuinn, G., & Fitz Gerald, R. (2002). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13, 447- 453.
- (6) de Oliveira Filho, J. G., & Egea, M. B. (2021). Sunflower seed byproduct and its fractions for food application: An attempt to improve the sustainability of the oil process. *Journal of Food Science*, 86(5), 1497-1510.
- (7) Guadix, A., Guadix, E., Páez-Dueñas, M., González-Tello, P., & Camacho F. (2000). Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79-89.
- (8) Löffler, A. (1986). Proteolytic enzymes: sources and applications. *Food technology*, 40(12), 63-70.
- (9) Aubes-Dufau, I.; Seris, J. & Combes, D. (1995). Production of Peptic Hemoglobin Hydrolysates: Bitterness Demonstration and Characterization. *Journal of Agricultural*
- (10) Lehninger, A. N., Cox, D., & de Bioquímica, M. P. (2006). 4ª Edición. Ed. *Omega*
- (11) Vioque, J. (Ed.). (2001). *Jornada internacional sobre proteínas alimentarias* (Vol. 47). Universidad de Sevilla.
- (12) [MEROPS - the Peptidase Database](#)

- (13) Brullo, A. (2003). *Aislamiento, purificación y caracterización de las endopeptidasas cisteínicas presentes en frutos de Pseudananas macrodontes (Morr.) Harms (Bromeliaceae)* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- (14) [Enzyme Nomenclature \(qmul.ac.uk\)](http://qmul.ac.uk)
- (15) Supuran, C., & Scozzafava, A. (2002). Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 12(2), 217-242.
- (16) Barret, A., Rawlings, N., & Woessner, J. (1998). *The handbook of proteolytic enzymes*. Academic Press, London.
- (17) David Troncoso, F., Alberto Sánchez, D., & Luján Ferreira, M. (2022). Production of plant proteases and new biotechnological applications: an updated review. *ChemistryOpen*, 11(3), e202200017.
- (18) Fernández-Lucas, J., Castañeda, D., & Hormigo, D. (2017). New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 91-101.
- (19) Natalucci C.L., A. Brullo, L.M.I. López, R.M. Hilal and N.O. Caffini (1996) "Macrodonin, a new bromelain-like protease isolated from fruits of *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*)", *Journal of Food Biochemistry* **19**: 443-454
- (20) Belitz & Grosch. (1997). *Química de los Alimentos*, 2da Ed. Aminoácidos, péptidos proteínas. Cap 1, pag 11-103 Ed. Acribia SA, Zaragoza España.
- (21) Errasti, M. E., Torres, M. J., Mercerat, J. R., Caffini, N. O., & Lopez, L. M. I. (2020). Plant proteases from *Carica papaya* and *Vasconcellea quercifolia* with potential application for a cleaner processing in tanneries. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38(5), 357-366.
- (22) Errasti, M. E., Caffini, N. O., & López, L. M. I. (2018). Proteolytic extracts of three Bromeliaceae species as eco-compatible tools for leather industry. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(22), 21459-21466.
- (23) Belitz & Grosch. (1997). *Química de los Alimentos*, 2da Ed. Aminoácidos, péptidos proteínas. Cap 1, pag 11-103 Ed. Acribia SA, Zaragoza España.

- (24) Jafari, S. M., Rashidinejad, A., & Simal-Gandara, J. (Eds.). (2023). *Handbook of Food Bioactive Ingredients: Properties and Applications*. Springer Nature.
- (25) Zhou, S., Hu, X., & Lin, L. (2024). Food-derived bioactive peptides: preparation, identification, and structure-activity relationship. *Frontiers in Nutrition*, *11*, 1412875.
- (26) Ruiz, E. D. C., González, M. A. N., & de la Cruz, V. M. T. (2016). Actividad biológica de proteínas y péptidos. In *Investigación en plantas de importancia médica* (pp. 313-350). omnia science.
- (27) Tonolo, F., Coletta, S., Fiorese, F., Grinzato, A., Albanesi, M., Folda, A., ... & de Bernard, M. (2024). Sunflower seed-derived bioactive peptides show antioxidant and anti-inflammatory activity: From in silico simulation to the animal model. *Food Chemistry*, *439*, 138124.
- (28) González-Pérez, S. (2003). Physico-chemical and functional properties of sunflower proteins. Ph.D. thesis Wageningen University, The Netherlands.
- (29) López, L. M., Sequeiros, C., Natalucci, C. L., Brullo, A., Maras, B., Barra, D., & Caffini, N. O. (2000). Purification and characterization of macrodantain I, a cysteine peptidase from unripe fruits of *Pseudananas macrodantes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Protein Expression and purification*, *18*(2), 133-140.
- (30) María Eugenia Errasti, María José Torres, Julio Ricardo Mercerat, Néstor Oscar Caffini & Laura María Isabel López (2020) Plant proteases from *Carica papaya* and *Vasconcellea quercifolia* with potential application for a cleaner processing in tanneries. *Biocatalysis and Biotransformation* *38*: 357-366
- (31) López, L.M.I., C. A. Viana, M. E. Errasti, M. L. Garro, J. E. Martegani, G. A. Mazzilli, C. D. T. Freitas, I. M. S. Araujo, R. O. da Silva, and M. V. Ramos (2017) Latex peptidases of *Calotropis procera* for dehairing of leather as an alternative to environmentally toxic sodium sulfide treatment. *Bioprocess Biosyst Eng* *40*:1391-1398
- (32) Gallazzi E., Gallo, A., Torres, M.J. (2023) “Valorización de las proteínas recuperadas del expeller de girasol mediante hidrólisis enzimática controlada y liberación de péptidos con actividad antioxidante” Libro de resúmenes Cytal 2023, pág. 575.

- (33) Blakesley, R.W.; Boezi, J.A. "A new Staining Technique for Proteins in Polyacrylamide Gels Using Coomassie Brilliant Blue G250" *Anal Biochem* 1977, 82 (2), 580- 582
- (34) Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., & Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of dairy science*, 66(6), 1219-1227.
- (35) Pardo, M. F., & Natalucci, C. L. (2002). Electrophoretic analysis (Tricine-SDS-PAGE) of bovine caseins. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 21(1), 57-60.
- (36) Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- (37) Beaubier, S., Albe-Slabi, S., Aymes, A., Biaines, M., Galet, O., & Kapel, R. (2021). *A Rational Approach for the Production of Highly Soluble and Functional Sunflower Protein Hydrolysates. Foods* 2021, 10, 664.
- (38) Chen, H. M., Muramoto, K. & Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean beta-conglycin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 574-578
- (39) Li X. X., Han, L. J. & Chen, L. J. (2008). In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1660- 6