

Obtención de hidrolizados y péptidos con actividad antioxidante a partir de proteínas de chía (*Salvia hispanica* L)

Galazzi, Eugenia (euge_gala@hotmail.com); Gallo, Alicia (aligsgo@gmail.com); Torres, M.José (mariajose.torres@nexo.unnoba.edu.ar)

Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires (UNNOBA)

Resumen

Las proteínas, aparte de su función nutricional, son reservorio de péptidos que regulan los procesos vitales de los organismos. Estos péptidos bioactivos pueden ser liberados de las proteínas por acción de peptidasas. El objetivo del trabajo fue revalorizar las proteínas de chía, presentes en el subproducto de la extracción de aceite de las semillas, mediante hidrólisis enzimática y la detección de péptidos con actividad antioxidante. A partir de harina desgrasada de chía se obtuvo un concentrado proteico mediante lavados con solución de etanol y ácido acético en agua (5:1:4), y centrifugación. El pellet fue secado en estufa lográndose un concentrado con 32,5% de proteínas y 6,37% de lípidos. La hidrólisis de las proteínas se desarrolló empleando distintas dosis de la peptidasa fúngica Flavourzyme (Novozyme Corp.) durante 180 min a 45°C y pH 7,5. El grado de hidrólisis (GH) de las proteínas se determinó empleando la técnica pH-stat. La reacción se detuvo por calentamiento en microondas y los hidrolizados fueron centrifugados. En los sobrenadantes se determinó la concentración de péptidos solubles por el método de Bradford y la actividad antioxidante mediante reducción del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y monitoreo de la absorbancia a 515 nm. Luego de hidrolizar las proteínas de chía con 1,54% de peptidasa fúngica (ml de enzima/100 g de proteína) se alcanzó un GH cercano al 4% y los péptidos solubles en agua aumentaron 3 veces. La capacidad antioxidante del hidrolizado, determinada como el porcentaje de inhibición del radical DPPH, fue 55,3%. La hidrólisis permitió transformar las proteínas de chía, de bajo costo, en un producto con mayor valor agregado que podrá ser incorporado en la formulación de alimentos funcionales.

Palabras clave: *Salvia hispanica*, hidrolizado proteico, péptidos bioactivos, actividad antioxidante

Introducción

Los alimentos ofrecen en su variada y compleja estructura, componentes de diferente naturaleza con demostrada actividad fisiológica, nombrados compuestos bioactivos. En éste grupo de sustancias se hallan las proteínas, que aparte de su función nutricional, son reservorio de péptidos que regulan los procesos vitales de los organismos.

Los péptidos bioactivos se han denominado como “fragmentos proteicos exógenos específicos que producen un impacto positivo en las funciones del cuerpo humano de manera de producir finalmente un efecto benéfico sobre la salud independientemente del nutricional” (Kitts & Weiler 2003).

La secuencia y tamaño de los péptidos, que pueden oscilar entre 2 y 20 aminoácidos y en algunos casos más, define la bioactividad evidenciada en ellos (De Lumen, 2005).

Para su obtención hay que liberarlos de la secuencia primaria de la proteína de la cual provienen mediante proteólisis microbiana, hidrólisis enzimática durante la digestión gastrointestinal, fermentación durante el procesamiento del alimento o hidrólisis enzimática in-vitro empleando proteasas de disímiles orígenes (Wang *et al.* 2018), siendo esta última el método más seleccionado a nivel laboratorio para obtener péptidos bioactivos. Con buen

resultado se han utilizado peptidasas de origen vegetal, microbiano o animal, ya sea solas o en combinación, con el fin de que la degradación proteolítica sea mayor (Morris Quevedo *et al.* 2001, Samaranayaka & Li Chan, 2016).

Los péptidos con actividad antioxidante son aquellos que en su secuencia contienen histidina y aminoácidos hidrofóbicos (Suetsuna *et al.* 2000, Peña Ramos *et al.* 2004).

Por lo que reemplazar los antioxidantes artificiales con péptidos antioxidantes naturales será beneficioso en la industria alimentaria porque no solo controlan la oxidación de los lípidos en los alimentos, sino que también suministran aminoácidos esenciales adicionales a los consumidores (Abeyrathne *et al.* 2014).

La reacción química por la cual una molécula se particiona en dos es un proceso de hidrólisis ya que participa el agua (Umesh Kumar *et al.* 2011).

Las enzimas, son proteínas que aceleran las reacciones químicas que se desarrollan en el organismo debido a su gran poder catalítico y su alto grado de especificidad sobre los sustratos (Nelson & Cox, 2005). Particularmente el uso de proteasas permite que la transformación de las proteínas sea más eficiente y menos costosa por su modo de acción, gran especificidad y por no generar

reacciones ni metabolitos secundarios (Briones Martínez y Cortez Vázquez, 2008).

La chía (*Salvia hispanica* L.), planta anual de verano, es uno de los cultivos con mayor importancia en las sociedades precolombinas ya que fue un elemento básico en su dieta por el aporte de nutrientes (Bueno *et al.* 2010).

En la semilla hay entre un 19 y 27% de proteínas de excelente y 30% de aceite (Ayerza, 2013; Sandoval Oliveros y Paredes López, 2013).

Las proteínas de la chía presentan un propicio perfil de aminoácidos esenciales (tabla 3) que se destaca por la presencia de metionina, lisina y cisteína en mayor porcentaje que en otras semillas (Ting *et al.* 1990). Yi Ding *et al.* (2018) demostraron que ésta semilla puede incorporarse a la dieta y así obtener un balance de proteínas más equilibrado sumado al consumo de otros granos.

Al extraer el aceite de la semilla de chía, se genera un residuo igual de rico en proteínas, que puede utilizarse para la elaboración de alimentos tanto para consumo humano como animal (Ayerza *et al.* 2002, Marineli *et al.* 2015).

Objetivos

El objetivo del trabajo fue revalorizar las proteínas de chía, presentes en el subproducto de la extracción de aceite de las semillas, mediante hidrólisis

enzimática y la detección de péptidos con actividad antioxidante.

Materiales y Métodos

- Obtención de concentrados proteicos: lavado con solución etanol - ácido acético – agua

Se agitó la harina desengrasada de chía en solución etanol:ácido acético:agua (10:1:9) durante 4 horas (particionado en dos lavados de 2 horas cada uno), 6 horas (2 lavados de 3 horas) y 8 horas (2 lavados de 4 horas), seguidos de centrifugación a 2.500 g durante 15 minutos. Los pellets fueron secados en estufa a 65°C para eliminar restos de solvente.

- Optimización de la hidrólisis de proteínas de chía con peptidasa fúngica

Para la hidrólisis de las proteínas de chía con peptidasa fúngica, la mezcla de reacción se preparó suspendiendo el concentrado proteico de chía al 10 % en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5 y agregando la solución comercial Flavourzyme al 1,54% (ml de enzima/100 g de proteína). La mezcla fue incubada en baño termostático a 45°C durante 3 horas, a diferentes tiempos se tomaron muestras y la reacción fue detenida por calentamiento en microondas hasta que la temperatura en el centro de la misma fue de 85°C - 90°C. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 9.900 g por 20 minutos y los sobrenadantes ricos en

péptidos fueron conservados en freezer a -20°C.

- Determinación del grado de hidrólisis (%GH) de las proteínas de chía

El seguimiento de la hidrólisis se realizó mediante el método del “pH–stat” manual empleando una micropipeta, un peachímetro, un vaso de precipitado y un baño termostático de temperatura graduable. El pH se mantuvo constante por adición de NaOH 0,1 M cada 5 minutos durante la primera hora, 10 minutos la segunda hora y 15 minutos la tercera hora de reacción. Se registraron los volúmenes de NaOH agregados para calcular el GH de acuerdo a la siguiente fórmula (Adler Nissen 1986):

$$GH\% = \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH}}{\alpha \times h_{tot} \times MP}$$

Donde α es el grado de disociación promedio de los grupos α -NH, MP es la masa de proteína en gramos (Kjeldahl) y h_{tot} el número total de uniones peptídicas en el sustrato proteico (meq/g).

- Cuantificación de péptidos solubles

La concentración de proteínas presentes en los sobrenadantes obtenidos al centrifugar los hidrolizados fue determinada por el método de Bradford (1976). El mismo se fundamenta en la unión del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 a las proteínas, la cual produce un corrimiento del máximo de

absorbancia de 465 nm (forma roja del colorante libre) a 595 nm (forma azul del complejo colorante-proteína), por lo que las lecturas se realizan a esta última longitud de onda.

Las curvas de calibración se confeccionaron utilizando seroalbúmina bovina en el rango de 0,1-1,0 mg/ml y la solubilidad expresada como la relación de proteínas solubles a proteínas totales.

- Búsqueda de péptidos con actividad antioxidante en los hidrolizados de proteínas de chía y en las fracciones obtenidas

Para evaluar la capacidad, la técnica seleccionada utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH (Ozgen *et al.* 2006, Halvorsen & Blomhoff, 2011). 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 (Villañoa *et al.* 2007.). 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 (Brand Williams *et al.* 1995).

Resultados y Discusión

- Obtención y caracterización de concentrados proteicos

Con el fin de eliminar los polifenoles presentes en la harina de chía, los cuales tienen actividad antioxidante que interfiere en la búsqueda de péptidos con dicha actividad, se ensayaron lavados con soluciones de etanol:ácido acético:agua (5:1:4). Se probaron diferentes tiempos de agitación de las suspensiones. Para seleccionar el tiempo óptimo de lavado, se evaluó la actividad antioxidante en los concentrados obtenidos (tabla 1)

Tabla 1. Actividad antioxidante de los concentrados proteicos obtenidos por lavado de la harina desengrasada de chía con solución de etanol y ácido acético durante diferentes tiempos

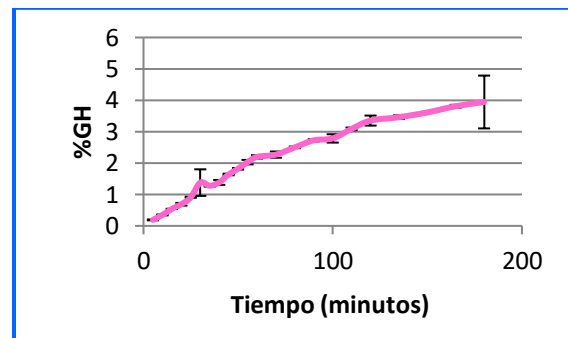
| Tiempo y cantidad de lavado | Actividad antioxidante (%) |
|-----------------------------|----------------------------|
| Harina desengrasada | 87,76 |
| 2 lavados de 2 horas | 27,36 |
| 2 lavados de 3 horas | 25,74 |
| 2 lavados de 4 horas | 25,44 |

De acuerdo a los resultados obtenidos, se escogió realizar dos lavados de 3 horas cada uno. Se determinó el contenido de proteínas y lípidos del concentrado, resultando del 32,5% y 6,37% respectivamente, y la humedad del 6,18%. El rendimiento de la extracción fue del 72,4%.

- Optimización de la hidrólisis de proteínas de chía con peptidasa fúngica y determinación del grado de hidrólisis

Se determinó el grado de hidrólisis (%GH) de las proteínas mediante el método del "pH-stat" manual por el lapso de 3 horas con 1,54% de Flavourzyme.

Gráfico 1. %GH de las proteínas de chía alcanzado con diferentes 1,54% de Flavourzyme



Como puede observarse en el gráfico 1 el grado de hidrólisis aumentó a medida que transcurrió la reacción para la concentración utilizada de la peptidasa llegando a ser 4%.

- Cuantificación de péptidos solubles

Se determinó la concentración de péptidos solubles en los hidrolizados mediante el método de Bradford (1976).

Los resultados se muestran en el gráfico

2.

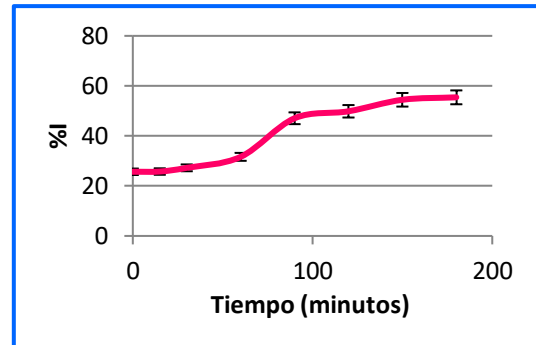
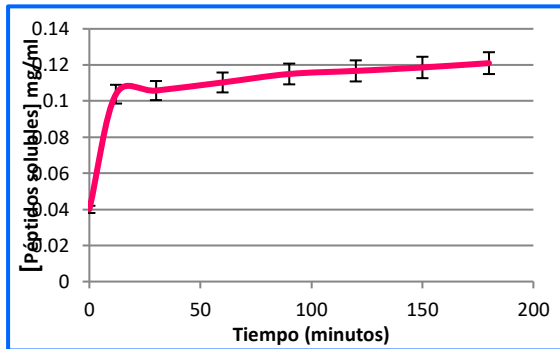


Gráfico 3. Concentración de péptidos solubles luego de 180 minutos de hidrólisis de las proteínas de chíá con de la peptidasa Flavourzyme

Como se observa en el gráfico 2 los péptidos solubles aumentaron 3 veces a lo largo de la hidrólisis.

- Búsqueda de péptidos con actividad antioxidante en los hidrolizados obtenidos

La presencia de péptidos con actividad antioxidante generados durante la hidrólisis de las proteínas de chíá, que se determinan con %I (inhibición por reducción) del radical DPPH en el hidrolizado a diferentes tiempos de reacción. Los resultados se muestran en el gráfico "X".

Gráfico "X". Actividad antioxidante de los hidrolizados de proteína de chíá con 1,54% de Flavourzyme a diferentes tiempos.

Como se muestra en el gráfico e el %I aumentó al transcurrir la reacción siendo más notorio a partir de los 60 minutos.

Conclusiones

La hidrólisis permitió transformar las proteínas de chíá, de bajo costo, en un producto con mayor valor agregado con actividad antioxidante que podrá ser incorporado en la formulación de alimentos funcionales.

Bibliografía

- Abeyrathne ,E. D. N. S., Lee, H. Y., Jo, C., Nam, K. C., Ahn, D.U. (2014). Enzymatic hydrolysis of ovalbumin and the functional properties of the hydrolysates. *Poult. Sci.*, 93; 2668-2677.
- Adler-Nissen J. (1986) *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Ayerza R. (2013) Seed composition of two chia (*Salvia hispanica* L.) genotypes which differ in seed color. *Emir. J. Food Agric.*, 25; 495-500.

- Ayerza, R. Seed composition of two chía (*Salvia hispanica* L.) genotypes which differ in seed color. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25 (7); 495-500. *Barcelona, España: Omega (pp. 1264).*
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28 (1); 25-30.
- Briones Martínez, R. y Cortés Vázquez, M.I. (2008). Herramienta biotecnológica de precisión. *Énfasis alimentación*, 5; 94-100.
- Bueno, M., Di Sapio, O., Barolo, M., Busilacchi, H., & Quiroga, M. C. (2010). Análisis de la calidad de los frutos de *Salvia hispánica* L. (Lamiaceae) comercializadas en la ciudad de Rosario (Santa Fe, Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas (BLACPMA)*9, 221-227.
- Chaudhary S., Sagar S., Kumar M., Sengar R.S, Tomar A. (2015). The Use of Enzymes in Food Processing: A Review. *South Asian Journal of Food Technology and Environment* 1(3-4); 190-210.
- De Lumen, B. (2005). Lunasin: a cancer-preventive soy peptide. *Nutr. Rev.*,63 (1), 16-21.
doi:10.2174/138955751866618042411075
4. [Epub ahead of print].
- enzimáticas en la obtención de hidrolizados proteicos a partir de *Chlorella vulgaris*. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.*, 15 (2); 85-89.
- Halvorsen, B.L. and Blomhoff, R. (2011). Determination of Lipid Oxidation Products in Vegetable Oils and Marine Omega-3 Supplements. *Food and Nutrition Research*, 55; 5792.
- Kitts D. D., Weiler K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design* 9, 1309-1323.
- Marineli, R.D.S., Lenquiste, S.A., Moraes, E.A., Marostica, M.R. (2015). Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (*Salvia hispanica* L.) in diet-induced obese rats. *Food Res Int.*, 76; 666-674.
- mechanistic study of hydrolysis of thiamine pyrophosphate (Cocarcboxylase) in aqueous buffer and micellar media. *International Journal of ChemTech Research*, 3 (3); 1088-1095.
- Modified 2,2-Azino-bis-3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (4); 1151-1157.
- Morris Quevedo, H.J., Arceo, A.A., Farnés, O.C., Díaz Abdala, R.T. (2001). Combinaciones
Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). Lehninger. Principios de bioquímica.

Olempska Beer, Z. S., Merker, R. I., Ditto, M. D., DiNovi, M.J. (2006). Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45, (2);144-158.

Peña Ramos, E. A., Xiong, Y. L., Arteaga, G. E. (2004). Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84; 1908-1918.

processing properties on restructured ham-like products. *Journal of food and drug analysis*, 26; 124-134.

Samaranayaka, A.G.P., Li Chan, E.C.Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *J Funct Foods*, 3; 229–254.

Sandoval Oliveros, M.R y Paredes López, O. (2013). Isolation and characterization of proteins from Chía seeds (*Salvia hispanica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61; 92-201.

Suetsuna, K., Ukeda, H., Ochi, H. (2000). *Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein*. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 11; 128-131.

Ting, I. P., Brown, J.H., Naqvi, J., Kumamoto, J., Matsumura, M. (1990). Chia: a potential oil crop for arid zones. *Proceedings of the First International Conference on New Industrial Crops and Products*. Eds. HH Naqvi, A Estilai and IP

Ting. *Association for the Advancement of Industrial Crops*, Riverside, USA, pp. 197-202.

Umesh Kumar, U., Rajanna, K. C., Saiprakash, P. K. (2011). A kinetic and Villañoa, D., Fernández-Pacóna, M. S., Moyáb, M. L., Troncosoa, A. M., García-Parillaa, M. C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71 (1); 230-235.

Wang, Y.L., Huang, Q., Kong, D., Xu, P. (2018). *Mini Rev Med Chem*.

Yi, D., Hui-Wen, L., Yi-Ling, L., Deng-Jye, Y., Yu-Shan, Y., Jr-Wei, C., Sheng-Yao, W., Yi-Chen, C. (2018). Nutritional composition in the chia seed and its

Financiamiento

El trabajo fue financiado con SIB 225/2017 otorgado por UNNOBA.

