

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS DE BROMELIAS AUTÓCTONAS Y SU APLICACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE BIOPÉPTIDOS A PARTIR DE PROTEÍNAS ALIMENTARIAS

Salese, Lucia

Bruno, Mariela A. (Dir.), Bernik, Delia L. (Codir.)

Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIProVe)

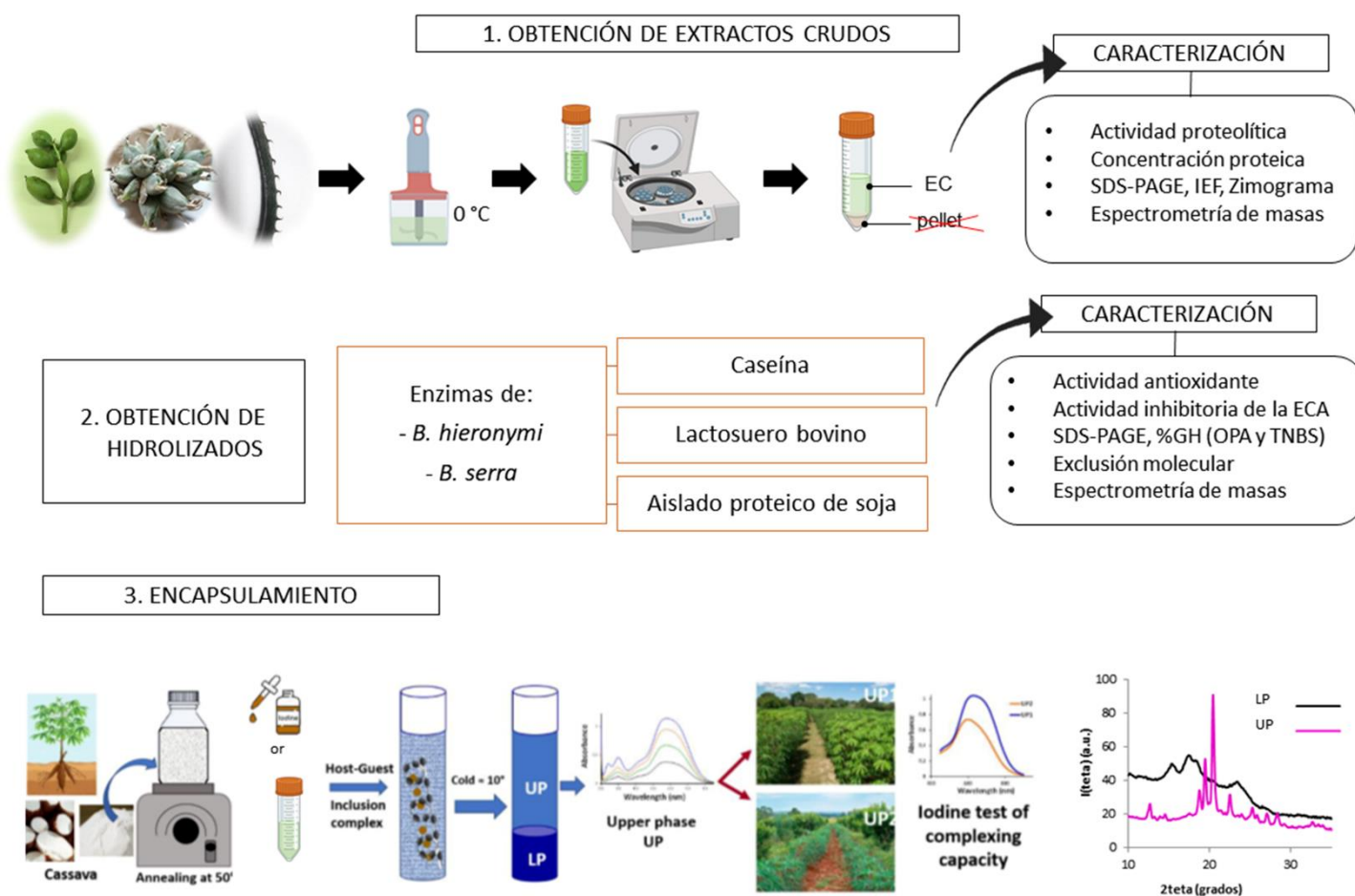
luciasalese@biol.unlp.edu.ar

PALABRAS CLAVE: bromeliaceae, fitopeptidasas, hidrolizados proteicos, péptidos bioactivos, encapsulamiento, actividad antioxidante, actividad antihipertensiva

CHARACTERIZATION OF NATIVE BROMELIAD PROTEASES AND THEIR APPLICATION IN THE PRODUCTION OF BIOPEPTIDES FROM FOOD PROTEINS

KEYWORDS: bromeliaceae, phytopeptidases, protein hydrolysate, bioactive peptides, encapsulation, antioxidant activity, antihypertensive activity

Resumen gráfico



Resumen

"Existen especies vegetales que producen grandes cantidades de proteasas, por lo que resultan interesantes para su uso en biotecnología. El objetivo del presente trabajo fue obtener, purificar y caracterizar peptidasas de bromelias autóctonas (Bromeliaceae) y emplearlas en la producción de péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias, con el fin de ser evaluados como posibles componentes en alimentos funcionales.

Se obtuvieron diferentes extractos crudos (ECs) a partir de frutos y/o ejes de las infrutescencias de *Bromelia hieronymi* y *B. serra*, y a partir de hojas de *Deinacantho urbanianum* (= *B. urbaniana*), resultando los ECs de fruto de *B. hieronymi* los más activos. Si bien el EC de *D. urbanianum* presentó baja actividad caseinolítica (AC), se observó mediante zimograma una banda activa de pI alcalino. De los ECs de *B. serra*, el más activo fue el de frutos de maduración intermedia, por lo que fue seleccionado para realizar su caracterización y definir las condiciones óptimas de trabajo.

Se identificó que las masas moleculares de las proteasas de *B. serra* están comprendidas entre 23,3-26,6 kDa. Dichas enzimas son de tipo cisteínico y su rango de pH óptimo es 6,3-9,0. Presentan estabilidad térmica a 23, 37 y 45 °C (120 min), y se inactivan luego de 10 min a 75 °C o de 2 min a 100 °C. La mayor actividad esterásica se obtuvo sobre el sustrato N- α -carboboxyzio-p-nitrofenil éster de L-Ala, a diferencia de las enzimas de *D.*

urbanianum que mostraron preferencia por el derivado de L-Gln. Mediante purificación parcial con acetona y etanol se observó que, con cuatro volúmenes de ambos solventes, se recupera más del 90% de AC respecto del EC. Al menos 4 bandas proteicas fueron observadas al IEF (pIs entre 8,4 y <3,5), siendo la región alcalina la más activa.

Se emplearon extractos de *B. serra* y *B. hieronymi* para hidrolizar proteínas de lactosuero, caseína y aislado proteico de soja (0-180 min, 45 y 55 °C), observándose en todos los casos la degradación progresiva de los sustratos. Se determinó la actividad antihipertensiva por el método de inhibición de la ECA y se ensayó la actividad antioxidante (AA) por el método ABTS (original y "quencher"), la técnica del blanqueamiento del β -caroteno y el método ORAC. Los hidrolizados más promisorios fueron separados por exclusión molecular y las fracciones más activas fueron analizadas por espectrometría de masas (ESI-Orbitrap).

Se diseñó un protocolo para encapsular hidrolizados de lactosuero con actividad antihipertensiva. Se utilizó almidón natural de mandioca, el cual fue sometido a tratamiento térmico (annealing) para favorecer la formación de complejos de inclusión con los biopéptidos, los cuales serían resistentes a la digestión gastrointestinal (RS5). El material encapsulante fue caracterizado por iodometría y la formación de complejos se estudió mediante SAXS, observándose la presencia de una señal alrededor de los 20^o (2 θ) característica de complejos con amilosa."