

## 20. Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

### **Hidrolizados enzimáticos de proteína de suero lácteo: obtención, purificación y evaluación de la presencia de propiedades bioactivas**

Eberhardt, Agustina<sup>1</sup>; Sihufe, Guillermo<sup>2</sup>; Manzo, Ricardo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>autor; <sup>2</sup>orientadores

agustinaeberhardt\_01@hotmail.com; gsihufe@intec.unl.edu.ar;

manzoricardo@yahoo.com.ar

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral

#### **Resumen**

Se obtuvieron hidrolizados enzimáticos a partir de concentrado de proteína de suero (WPH, “*Whey Protein Hydrolysate*”), los cuales fueron purificados y caracterizados evaluando la presencia de funciones biológicas y tecnológicas de interés. El perfil peptídico evaluado por RP-HPLC, mostró una importante degradación de las proteínas enteras a péptidos pequeños. Respecto a las propiedades tecnofuncionales, se observó una destacable mejora en la estabilidad térmica y en la solubilidad. Finalmente, los hidrolizados exhibieron importantes funciones biológicas, siendo más relevantes las actividades antihipertensiva y antioxidante, y en menor medida la antimicrobiana. Dicha investigación permitió obtener un extracto hidrolizado con interesantes propiedades que podrían posibilitar la incorporación futura del mismo como ingrediente funcional en una matriz alimentaria.

**Palabras clave:** hidrolizados, suero lácteo, Alcalasa, péptidos bioactivos, propiedades funcionales.

#### **Introducción**

La industria láctea produce grandes cantidades de suero como subproducto derivado de la industria quesera, lo que genera inconvenientes asociados al costo de su acarreo y al poder contaminante del mismo. Aproximadamente el 90% del

volumen total de leche utilizada en la fabricación de quesos es eliminado como lactosuero, el cual retiene alrededor del 55% del total de los ingredientes de la leche tales como lactosa, proteínas solubles (no caseínicas), lípidos y sales minerales (Parra Huertas, 2009).

El procesamiento de las proteínas del suero puede producir péptidos bioactivos que pueden desencadenar efectos fisiológicos en el cuerpo humano. Varios péptidos con diversas funciones biológicas han sido identificados en los hidrolizados enzimáticos de suero de leche, informándose actividades de tipo opioide, hipotensiva, antioxidante, antimicrobiana, entre otras (Alvarado Carrasco y Guerra, 2010). Estos aspectos, sumado a su elevado valor biológico/nutricional (fuente de energía, AAE, vitaminas y minerales) y a su bajo costo de obtención, lo convierten en un producto con un excelente potencial de uso como aditivo, ingrediente o alimento en la industria alimenticia (Abughoush y col., 2008).

La modificación de las proteínas de la leche basada en la hidrólisis enzimática constituye una herramienta potencial para optimizar las propiedades tecnofuncionales, biológicas y nutricionales de las mismas en los productos alimenticios (de Castro y col., 2015). La hidrólisis controlada de proteínas de suero libera péptidos bioactivos, la mayoría de los cuales aún no se han caracterizado en el mismo nivel que aquellos provenientes de las caseínas (Madureira y col., 2010). Teniendo en cuenta su posible utilidad desde la perspectiva de la salud humana y la tecnología de los alimentos, el aumento de los esfuerzos de investigación se

centran en la obtención de péptidos e hidrolizados bioactivos derivados del suero (Corrêa y col., 2014). En la actualidad, el principal reto en la producción de péptidos bioactivos mediante hidrólisis enzimática *in vitro* es encontrar la enzima hidrolítica adecuada y las condiciones fisicoquímicas que puedan favorecer la bioactividad y su rendimiento en la producción (Madureira y col., 2010). En este contexto, en el presente trabajo se propuso obtener hidrolizados enzimáticos a partir de concentrado de proteínas de suero (WPC, “*Whey Protein Concentrate*”) por acción de una endopeptidasa comercial de uso habitual en la industria alimenticia, para luego caracterizarlos evaluando sus posibles efectos biológicos y propiedades funcionales.

### Objetivos

- Obtener hidrolizados enzimáticos de proteína de suero lácteo empleando la enzima comercial Alcalasa, bajo condiciones establecidas experimentalmente.
- Caracterizar los extractos de hidrolizados obtenidos, estudiando aquellas propiedades fisicoquímicas, bioactivas y tecnofuncionales que son de relevancia, tanto desde un punto de vista científico como tecnológico.

## **Materiales y Métodos**

### ***Obtención de los hidrolizados enzimáticos***

Los hidrolizados enzimáticos se obtuvieron a partir de una solución de concentrado de proteínas de suero (WPC 80, Arla Foods, Argentina) al 7% (m/v) de proteínas. La enzima empleada fue Alcalasa™ 2.4L (EC 3.4.21.62) de *Bacillus licheniformis* (Novozymes, Dinamarca). Las condiciones de trabajo fueron preestablecidas de modo de lograr un grado de hidrólisis del 13%, asegurando minimizar los problemas de alergenicidad asociados a las proteínas del lactosuero. La reacción de hidrólisis se llevó a cabo utilizando el método del pH-stato (Fenoglio, 2013), empleando un reactor tipo Batch agitado con control de pH y temperatura. La misma comenzó con el agregado de la enzima sobre la solución de WPC que se encontraba en agitación en el reactor a 50°C y a un pH cercano a 9 alcanzando una relación E/S (v/v) de 1/1200. El pH se mantuvo constante a lo largo de toda la reacción mediante la adición de NaOH 0,5 N, deteniéndose al lograr el DH deseado a través de la medida del volumen de base consumido. Inmediatamente, las muestras fueron sometidas a 95°C por 5 min para lograr la inactivación térmica de la enzima. Además, se realizaron los correspondientes blancos de reacción, correspondientes a las soluciones de

WPC sometidas a las mismas condiciones operativas del ensayo de hidrólisis (agitación, temperatura, pH y tiempo), omitiendo la etapa de adición de la enzima y su consecuente inactivación térmica.

### ***Acondicionamiento de los hidrolizados***

Los hidrolizados obtenidos fueron acondicionados para su posterior caracterización y evaluación. Para ello, se evaluaron etapas de centrifugación, filtración y liofilización, de manera tal de estudiar la influencia de cada una de ellas sobre las características y la composición del extracto obtenido. En este sentido, las fracciones (F) de estudio fueron 5, entre ellas: F1: WPC sin tratar; F2: control sin hidrolizar; F3: WPH sin tratamiento posterior; F4: WPH centrifugado y; F5: WPH centrifugado y filtrado.

### ***Caracterización de los hidrolizados***

El contenido de proteínas de las fracciones obtenidas se determinó mediante el método de nitrógeno total de Kjeldahl según el equipo semiautomático Büchi Labortechnik AG (1998). Para el análisis del perfil peptídico se empleó la cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), metodología descrita por Fenoglio y col. (2016). La termoestabilidad, la solubilidad, la capacidad espumante y la estabilidad de la espuma, han sido las propiedades tecnofuncionales evaluadas. Para el estudio de la estabilidad térmica se adaptó el método descrito por Ceruti y col.

(2014). El análisis de la solubilidad se realizó mediante la metodología descrita por Horax y col. (2017) con algunas modificaciones. Para la formación de espuma en el estudio de la capacidad espumante y su estabilidad, se adaptó la metodología de Foschiatti y col. (2009) y se empleó la ecuación de Klompong y col. (2007) para la cuantificación de dichas propiedades. El estudio de las propiedades bioactivas se realizó mediante la determinación de la actividad antimicrobiana, antihipertensiva y antioxidante. La actividad antimicrobiana se determinó mediante el método de difusión en agar (Tagg y Mc Given, 1971) modificado por Cardoso y col. (2012). La actividad antihipertensiva se evaluó a través de la actividad inhibitoria sobre la enzima convertidora de la angiotensina I (ECA), empleando el método espectrofotométrico descrito por Cian y col. (2011). La actividad antioxidante se determinó mediante la metodología descrita por Re y col. (1999), basada en la eliminación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup>.

Cada uno de los ensayos de caracterización se aplicó a las fracciones de hidrolizado (3, 4 y/o 5) y a las fracciones sin hidrolizar (1 y/o 2), a fin de comparar la influencia del proceso de hidrólisis sobre las propiedades de las proteínas del lactosuero. En la Figura 1 se detallan las metodologías de análisis realizadas a cada fracción.

### Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se usó ANOVA, de manera tal de evaluar la influencia de diferentes factores tales como el proceso de hidrólisis, la concentración de los extractos y el pH del medio sobre las diferentes variables de estudio. Cuando el efecto de los mismos fue significativo ( $P < 0,05$ ), se realizó una comparación de medias por el método LSD. Para ello, se utilizó el software Statgraphics (Statgraphics Inc., Rockville, MD, Estados Unidos).

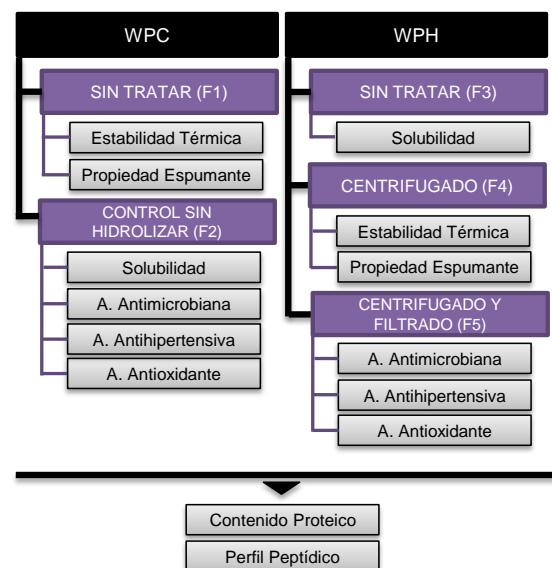


Figura 1. Ensayos de caracterización realizados a cada una de las fracciones.

### Resultados y Discusión

Los correspondientes **contenidos de nitrógeno y proteína láctea** de cada fracción analizada, se muestran en la Tabla 1. Se puede apreciar que las soluciones de WPC (F1 y F2) fueron las que presentaron mayor contenido

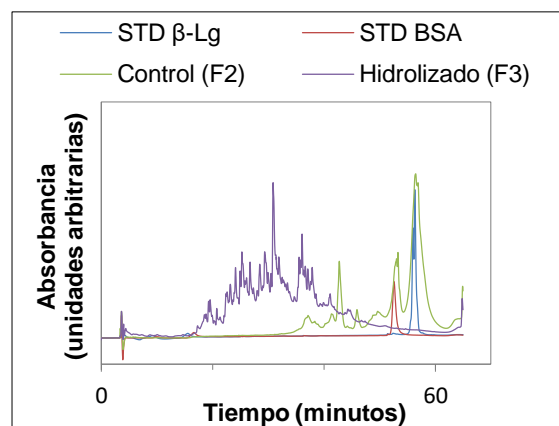
proteico. La diferencia en la cantidad de proteínas podría deberse a una reacción suave de desaminación tanto de péptidos y aminoácidos libres como de ciertas sustancias nitrogenadas no proteicas, producida por la hidrólisis junto al tratamiento térmico prolongado, trayendo como consecuencia una mínima disminución del N% en los WPH en relación a las soluciones de WPC. Dentro de las observaciones más destacadas, se puede apreciar que las diferentes fracciones de hidrolizados enzimáticos (F3, F4 y F5) presentaron un contenido similar de proteínas, cuyas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ). Este resultado es interesante ya que nos estaría indicando que no existen diferencias en el contenido proteico de las fracciones mencionadas en relación al acondicionamiento de las mismas.

**Tabla 1.** Valores promedios y desviaciones estándar correspondientes al contenido de nitrógeno determinado por el método Kjeldahl.

Fracción	N (%)	N expresado como proteína láctea (%)
F1	1,054 ± 0,004	6,72 ± 0,02 <sup>b</sup>
F2	1,127 ± 0,018	7,19 ± 0,12 <sup>c</sup>
F3	0,954 ± 0,000	6,09 ± 0,00 <sup>a</sup>
F4	0,977 ± 0,046	6,23 ± 0,29 <sup>a</sup>
F5	0,987 ± 0,007	6,30 ± 0,05 <sup>a</sup>

**F1:** WPC sin tratar; **F2:** control sin hidrolizar; **F3:** WPH sin tratar; **F4:** WPH centrifugado; **F5:** WPH centrifugado y filtrado. <sup>a-c</sup> Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

En la Figura 2 se pueden observar los cromatogramas resultantes del análisis del **perfil peptídico** correspondientes al control sin hidrolizar (F2) y al WPH sin tratar (F3), como así también al de los estándares analizados de Albúmina Sérica Bovina (BSA) y  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG).



**Figura 2.** Cromatogramas correspondientes a los extractos de WPC (F2), WPH (F3) y a los reactivos estándares analizados.

En cuanto al análisis cromatográfico de los hidrolizados se observó una muy buena cantidad de picos entre los 20 y los 40 min de corrida, con una desaparición casi completa de la BSA (53 min de corrida) y la  $\beta$ -LG (56 min). Por otra parte, no se observaron picos fuertemente hidrofóbicos (zona final de los cromatogramas). Esto es sumamente alentador, puesto que se ha asociado la liberación de grupos hidrófobos durante la hidrólisis de proteínas con el desarrollo del amargor (Sah y col., 2016), lo cual afecta negativamente la calidad del producto, limitando su utilización como aditivo. Finalmente, los perfiles peptídicos de las

fracciones de hidrolizados (F3, F4 y F5) resultaron ser muy similares entre sí con cromatogramas prácticamente superpuestos (datos no mostrados), confirmando a lo observado en el N%.

La **estabilidad térmica** evaluada mediante el análisis visual de la viscosidad y de la formación de geles a distintos tiempos luego del tratamiento térmico, se determinó en el extracto de WPC sin tratar (F1) y de WPH centrifugado (F4), a 3 niveles de pH (6,5-7-7,5) y a 3 concentraciones de proteínas (6-7-8%). Las muestras de WPH en todas las condiciones analizadas no presentaron cambios luego del tratamiento térmico, no registrándose la formación de ningún tipo de gel. Por el contrario, las soluciones de WPC mostraron cambios significativos (Tabla 2). El tratamiento térmico produjo la formación de gel en todas las soluciones de WPC de pH 6,5, observándose dicho efecto tanto a tiempo 0 como a las 24 h (1440 min) en las soluciones al 7 y 8% (m/v) de proteínas. Por otro lado, en la solución al 6% (m/v), la estructura de gel se rompió parcialmente a las 24 h posteriores al tratamiento térmico, mientras que las soluciones de WPC al 6% (m/v) de proteínas y de pH 7 y 7,5 mantuvieron su consistencia fluida. Sin embargo, al momento de fluir presentaban una mínima adhesión al tubo y mostraron un anillo adherido al vidrio en la parte superficial a las 24 h después del ensayo.

**Tabla 2.** Estabilidad térmica de las soluciones de WPC a diferentes pH y tiempos.

	pH	Tiempo (min)							
		15	30	45	60	75	90	120	1440
6	6,5	G	G	G	G	G	G	G	GI
	6,5	G	G	G	G	G	G	G	GI
	7	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
	7	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
	7,5	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
	7,5	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
7	6,5	G	G	G	G	G	G	G	G
	6,5	G	G	G	G	G	G	G	G
	7	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
	7	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
	7,5	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
	7,5	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
8	6,5	G	G	G	G	G	G	G	G
	6,5	G	G	G	G	G	G	G	G
	7	GI	+V	+V	+V	+V	+V	+V	+V
	7	GI	+V	+V	+V	+V	+V	+V	+V
	7,5	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
	7,5	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC

**G:** formación de gel; **GI:** formación de gel inestable.

**SC:** sin cambio de viscosidad; **+V:** aumento de la viscosidad de la solución.

Lo mismo se observó en las muestras de WPC al 7% (m/v) a pH 7 y 7,5, y en la muestra al 8% (m/v) de proteínas pH 7,5; siendo el efecto más marcado a medida que la concentración proteica aumentó. La solución de WPC 8% (m/v) de proteínas pH 7, presentó inicialmente (0 min) una estructura de gel que se desarmó durante la inclinación del tubo al momento de la observación, quedando en forma líquida pero de consistencia más viscosa que la muestra original sin ser tratada. Frente a estas observaciones se puede concluir que las soluciones de hidrolizados son mucho más estables al calor en comparación con las soluciones de WPC, las cuales al ser sometidas al calentamiento presentaron un importante

grado de desnaturalización térmica, fundamentalmente a pH más bajos.

La **solubilidad** de las muestras analizadas (F2 y F3, 7% m/v de proteínas) se determinó a 3 niveles de pH (4-5-6). Se pudo apreciar que tanto la hidrólisis como el pH y la interacción de ambos factores tuvieron una influencia estadísticamente significativa (Tabla 3).

**Tabla 3.** Valores promedios y desviaciones estándar correspondientes al porcentaje (%) de solubilidad proteica.

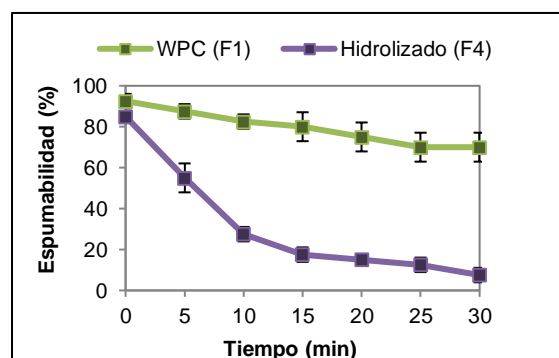
	pH	Control (F2)	Hidrolizado (F3)
<b>Solubilidad proteica (%)</b>	4	84,6 ± 2,3 <sup>b</sup>	99,7 ± 2,6 <sup>c</sup>
	5	62,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	98,2 ± 1,1 <sup>c</sup>
	6	82,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	100,0 ± 0,4 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup> Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

En todos los valores de pH se observó una muy alta solubilidad de los hidrolizados, cercana al 100% y significativamente mayor que sus correspondientes controles sin hidrolizar. Asimismo, no se registraron diferencias significativas debidas al pH en los valores de solubilidad correspondientes a los extractos hidrolizados. Respecto a los controles sin hidrolizar, se observaron diferencias significativas de la solubilidad en función del pH, ya que los mismos presentaron una solubilidad significativamente menor a pH 5 que a pH 4 y 6. Esta menor solubilidad, podría deberse a la cercanía al punto isoeléctrico de las proteínas de suero, donde éstas

pierden su carga eléctrica neta y con ello la solubilidad. Por otra parte, la mayor solubilidad mostrada por el WPH respecto al WPC está altamente correlacionada con la reducción en el peso molecular y un aumento en el número de unidades polipeptídicas más pequeñas, más hidrófilas y más solvatadas a través de la hidrólisis enzimática, lo que resulta en un aumento en la densidad de la carga neta expuesta (de Castro y col., 2015).

El estudio de la **capacidad espumante y estabilidad de la espuma** de las muestras (F1 y F4) se llevó a cabo a la concentración de proteínas de 7% m/v y a pH 6. Tanto las proteínas del suero hidrolizadas como sin hidrolizar, presentaron similar capacidad espumante (tiempo 0), no siendo las diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ). Por otra parte, en la Figura 3 se presentan las curvas de estabilidad (expresadas como un porcentaje del correspondiente valor inicial) dentro de los 30 min posteriores a la formación de la espuma.



**Figura 3.** Curvas de estabilidad de la espuma.

Se puede apreciar que los hidrolizados exhibieron una fuerte caída de la estabilidad espumante durante los primeros 15 minutos (de 85% a 17,5%), volviéndose más gradual en los últimos 15 min, y con diferencias que no fueron estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ). Asimismo, las muestras de WPC también mostraron una disminución de la estabilidad de la espuma, sin embargo, esta ocurrió en una forma más gradual durante todo el tiempo evaluado. Al final del ensayo (30 min), la capacidad espumante del WPC fue del 70% mientras que la del hidrolizado resultó ser aproximadamente 10 veces menor (7,5%). Diversos autores (Panyam y Kilara, 1996; Sinha y col., 2007) indicaron que la hidrólisis enzimática de proteínas de suero incrementó el volumen de espuma, a la vez que disminuyó considerablemente la estabilidad en comparación con la proteína intacta. Por otra parte, Severin y Xia (2006), informaron que los WPH obtenidos con Alcalasa, al 15% y al 20% DH, no formaron espuma en absoluto, mientras que si lo hicieron aquellos con 10% y 5% DH, presentando este último un mayor volumen que el del WPC intacto. Sin embargo, hay algunos hallazgos contradictorios sobre cómo el DH afecta la funcionalidad. Una explicación probable es que, dado que el DH varía mucho con la enzima y el sustrato, la relación con las propiedades funcionales también variará

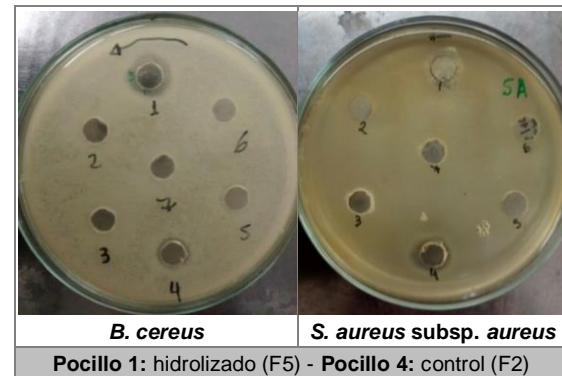
(Foegeding y col., 2002). En este sentido, es muy importante determinar las condiciones de hidrólisis de acuerdo a la funcionalidad buscada. No obstante, la diferencia observada entre los hidrolizados y la proteína intacta ofrece una interesante alternativa de uso de los mismos en el caso de formulaciones donde no se desea la generación de espuma como es el caso de la mayoría de las bebidas.

La **actividad antimicrobiana** contra *Escherichia coli* DBFIQ Ec 9 (E.C), *Bacillus cereus* DBFIQ B 28 (B.C), *Listeria monocytogenes* LM 4 (L.M) y *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Sa 1 (S.A), se determinó a los extractos control sin hidrolizar (F2) y WPH centrifugado y filtrado (F5) a 3 concentraciones de proteína (10-30-100 mg/ml), pH 6. Sólo se observó actividad inhibitoria a la máxima concentración ensayada (100 mg/ml) tanto en los extractos hidrolizados como en aquellos sin hidrolizar. En la Figura 4 se muestran a modo de ejemplo algunos halos inhibitorios obtenidos. Los hidrolizados presentaron actividad antimicrobiana frente a *Bacillus cereus* (pocillo 1; diámetro del halo:  $14 \pm 0$  mm), *Listeria monocytogenes* (no mostrado; diámetro del halo:  $12 \pm 2,83$  mm) y *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (pocillo 1; diámetro del halo:  $13,25 \pm 0,35$  mm). Asimismo, las muestras control exhibieron actividad



inhibitoria, aunque dichos valores evidenciaron ser mucho menores que las muestras de hidrolizados (pocillo 4; diámetro de halos:  $8,5 \pm 0,71$  mm, 8 mm y  $10 \pm 1,41$  mm, para B.C, L.M y S.A, respectivamente). Los resultados mostraron la presencia de determinantes peptídicos con actividad inhibitoria del crecimiento hacia bacterias Gram positivas, mientras que la cepa Gram negativa ensayada, no resultó inhibida por los extractos evaluados. Esto se explica claramente por la diferencia estructural de las membranas celulares, siendo los organismos Gram positivos más sensibles a la acción de sustancias antimicrobianas peptídicas que las bacterias Gram negativas (Demers-Mathieu y col., 2013). Adicionalmente, los extractos controles mostraron acción inhibitoria, aunque menor a la observada para los hidrolizados, pudiéndose tratar de compuestos no peptídicos con actividad antimicrobiana presentes en el WPC. Debido a estos resultados, puede mencionarse que la acción de los hidrolizados sobre las bacterias ensayadas fue específica y superior, en comparación a la de los controles ensayados. Dichas propiedades antimicrobianas exhibidas por las proteínas de suero se han asociado previamente con la Lactoferrina, Lactoperoxidasa, Lisozima e Inmunoglobulinas, como también a los

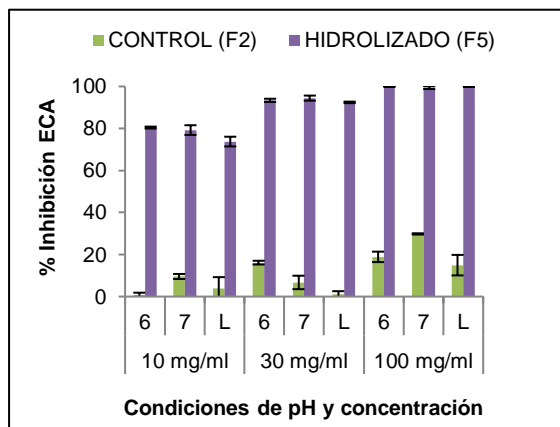
peptidos antimicrobianos muy potentes liberados mediante la hidrólisis enzimática de las proteínas de suero de diferentes especies (Adbel-Hamid y col., 2016).



**Figura 4.** Halos de inhibición del crecimiento, observados en dos cepas Gram positivas.

La **actividad antihipertensiva** se determinó a los extractos control sin hidrolizar (F2) y WPH centrifugado y filtrado (F5), a 3 niveles de pH (6, 7 y libre en agua) y a 3 concentraciones de proteína (10-30-100 mg/ml). Se observó que el grado (%) de inhibición de la ECA resultó significativamente afectado por todos los factores evaluados (hidrólisis, concentración del extracto y pH del medio). En la Figura 5 se expresan los grados de inhibición promedio. Respecto al proceso de hidrólisis, se observó un fuerte efecto inhibitorio de los hidrolizados, mientras que las muestras sin hidrolizar presentaron un efecto mucho menor. Por otro lado, la concentración resultó tener una clara influencia en la inhibición observada, ya que en general se observó que a mayor concentración, mayor es el efecto inhibitorio determinado. En cuanto

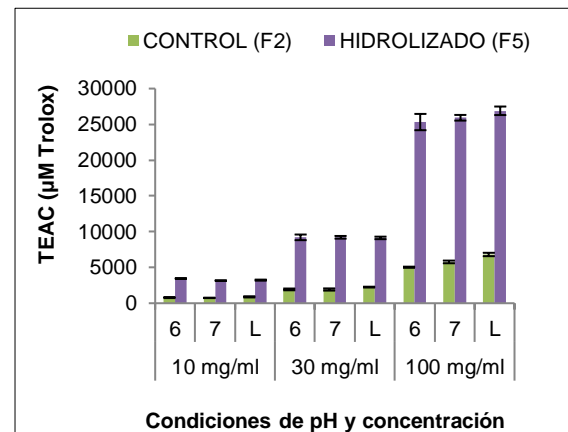
al efecto del pH, en las soluciones de hidrolizados sólo tuvo influencia significativa en la menor concentración (10 mg/ml), apreciándose a pH 6 y 7 un mayor efecto inhibitorio que el observado para los hidrolizados testeados a pH libre. En los extractos de control sin hidrolizar, el efecto del pH fue diferente, no observándose una tendencia clara para las 3 concentraciones ensayadas.



**Figura 5.** Capacidad antihipertensiva de las muestras en función del pH y la concentración.

El estudio de la **actividad antioxidante** se realizó a las mismas muestras y condiciones utilizadas en el estudio de la actividad antihipertensiva, a través de la metodología de eliminación de radicales libres, empleando Trolox (análogo de la Vitamina E) como antioxidante de referencia. En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos expresados como TEAC (capacidad antioxidante equivalente al Trolox). Respecto al análisis estadístico, se observó que los valores de TEAC resultaron significativamente afectados por todas las variables estudiadas

(hidrolisis, concentración y pH del medio). Asimismo, al evaluar las interacciones entre las mismas, sólo fueron significativas la interacción entre muestra-concentración y la interacción concentración-pH.



**Figura 6.** Capacidad antioxidante de las muestras en función del pH y la concentración.

Al igual que lo observado en el ensayo de actividad antihipertensiva, se obtuvo una fuerte actividad antioxidante en los hidrolizados en comparación con el control sin hidrolizar. Asimismo, la concentración tuvo una marcada influencia de modo que a medida que esta aumentaba también lo hizo la actividad antioxidante. Con respecto al pH, únicamente tuvo influencia en la mayor concentración ensayada (100 mg/ml), siendo mayor la actividad antioxidante a pH libre, seguido de las muestras a pH 7, y por último a pH 6. Para poner en contexto los resultados obtenidos, es necesario mencionar a manera de ejemplo que los valores de TEAC correspondientes a una solución de hidrolizado de 10 mg/ml resultaron

equivalentes a los informados para 100 ml de café o 1 litro de jugo de naranja, dos reconocidas bebidas con alto poder antioxidante (Pellegrini y col., 2003).

### Conclusiones

La presente investigación demostró que, desde el punto de vista del contenido proteico y del perfil peptídico, los procesos de acondicionamiento no tuvieron una influencia muy marcada, resultando ser las fracciones de WPH muy similares entre sí. Asimismo, los cromatogramas reflejaron claramente cómo la hidrólisis enzimática promovió la liberación de péptidos de menor tamaño, mientras las principales proteínas del WPC se degradaron de manera muy notoria. El análisis de las propiedades tecnofuncionales, mostró que la hidrólisis enzimática del WPC fue muy beneficiosa puesto que mejoró significativamente tanto la estabilidad térmica como también la solubilidad. En cuanto a las propiedades de superficie, los hidrolizados obtenidos mostraron interesantes diferencias respecto de las proteínas intactas al evaluar la formación y estabilidad de la espuma. El estudio, además, reveló la presencia de péptidos bioactivos con importantes funciones biológicas, siendo las más relevantes las actividades antihipertensiva y antioxidante y, en menor medida, la antimicrobiana. La bioactividad encontrada en los

hidrolizados confirma el potencial de las proteínas del lactosuero como fuente de péptidos bioactivos, y la efectividad que presenta la hidrólisis enzimática para la liberación de los mismos. Finalmente, los hidrolizados obtenidos en esta investigación presentaron interesantes aptitudes tecnológicas y bioactivas, que incentivan la evaluación de una posible aplicación alimentaria en futuros estudios.

### Bibliografía

- Abdel-Hamid M, Goda HA, De Gobba C, Jenssen H, Osman A. 2016. Antibacterial activity of papain hydrolysed camel whey and its fractions. *International Dairy Journal*, 61, 91-98.
- Abughoush M, Al-Mahasneh M, Samhour M, Al-Holy M, Herald T. 2008. Formulation and fuzzy modeling of viscosity of an orange-flavored carboxymethylcellulose-whey protein isolate beverage. *International Journal of Food Engineering*, 4 (7), 1-13.
- Alvarado Carrasco C, Guerra M. 2010. Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 23 (1), 42-49.
- Büchi Labortechnik AG. 1998. Nitrogen determination according to Kjeldahl, order No. 97765 (Büchi, Flawil, Suiza).
- Cardoso MdM, Manzo RM, Tonarelli GG, Simonetta AC. 2012. Characterisation of a cell-free supernatant obtained from cultures of *Enterococcus faecalis* DBFIQ

E24 with antagonistic activity against bacteria, yeasts and moulds. *International Journal of Dairy Technology*, 65 (4), 568-577.

Ceruti RJ, Sihufe GA, Zorrilla SE. 2014. Gelificación en frío de suspensiones de proteínas de suero lácteo con diferentes niveles de concentración, pH y agregado de  $Ca^{2+}$ . V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina.

Cian RE, Luggren P, Drago SR. 2011. Effect of extrusion process on antioxidant and ACE inhibition properties from bovine haemoglobin concentrate hydrolysates incorporated into expanded maize products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62 (7), 774-780.

Corrêa APF, Daroit DJ, Fontoura R, Meira SMM, Segalin J, Brandelli A. 2014. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides*, 61, 48-55.

De Castro RJS, Bagagli MP, Sato HH. 2015. Improving the functional properties of milk proteins: focus on the specificities of proteolytic enzymes. *Current Opinion in Food Science*, 1, 64-69.

Demers-Mathieu V, Gauthier SF, Britten M, Fliss I, Robitaille G, Jean J. 2013. Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by

nanofiltration. *International Dairy Journal*, 28 (2), 94-101.

Fenoglio C, Vierling N, Manzo R, Ceruti R, Sihufe G, Mammarella E. 2016. Whey Protein Hydrolysis with Free and Immobilized Alcalase®: Effects of Operating Parameters on the Modulation of Peptide Profiles Obtained. *American Journal of Food Technology*, 11 (4), 152-158.

Fenoglio, CL. 2013. Producción de hidrolizados enzimáticos de concentrado proteico de lactosuero (WPC) para la formulación de alimentos especiales. Tesis Doctoral. Facultad de Ingeniería Química (UNL), Santa Fe, Argentina, 215 p.

Foegeding EA, Davis JP, Doucet D, McGuffey MK. 2002. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 13 (5), 151-159.

Foschiatti ML, Perduca M, Santiago L, Rubiolo A, Carrara C. 2009. Estudio de formación y estabilidad de espumas formuladas con WPI y un galactomanano. XII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Concordia, Entre Ríos.

Horax R, Vallecios MS, Hettiarachchy N, Osorio LF, Chen P. 2017. Solubility, functional properties, ACE-I inhibitory and DPPH scavenging activities of Alcalase hydrolysed soy protein hydrolysates.

International Journal of Food Science & Technology, 52 (1), 196-204.

Klompong V, Benjakul S, Kantachote D, Shahidi F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chemistry, 102 (4), 1317-1327.

Madureira AR, Tavares T, Gomes AMP, Pintado ME, Malcata FX. 2010. Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. Journal of Dairy Science, 93 (2), 437-455.

Panyam D, Kilara A. 1996. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. Trends in Food Science & Technology, 7 (4), 120-125.

Parra Huertas RA. 2009. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. Revista Facultad Nacional de Agronomía – Medellín, 62 (1), 4967-4982.

Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F. 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. The Journal of Nutrition, 133 (9), 2812-2819.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine, 26 (9-10), 1231-1237.

Sah BNP, Vasiljevic T, McKechnie S, Donkor ON. 2016. Antioxidative and antibacterial peptides derived from bovine milk proteins. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1-15.

Severin S, Xia WS. 2006. Enzymatic hydrolysis of whey proteins by two different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. Journal of Food Biochemistry, 30 (1), 77-97.

Sinha R, Radha C, Prakash J, Kaul P. 2007. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. Food Chemistry, 101 (4), 1484-1491.

Tagg JR, Mc Given AR. 1971. Assay systems for bacteriocins. Applied and Environmental Microbiology, 21 (5), 943-947.

### **Agradecimientos**

La autora agradece a los Dres. Guillermo Sihufe y Ricardo Manzo, Directores de la Cientibeca (UNL) y del Trabajo Final de la Licenciatura en Nutrición (FBCB) que posibilitaron la obtención de los resultados presentados en este trabajo.

### **Financiamiento**

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional del Litoral (UNL) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).