

## CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE PÉPTIDOS OBTENIDOS DE HIDROLIZADOS DE TILAPIA CON BROMELINA Y PAPAÍNA

Arias A.<sup>a\*</sup>, Pérez S.<sup>a</sup>, López O.<sup>a</sup>, Mendoza R.<sup>a</sup> y Aguilera C.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Nuevo León, Fac. Ciencias Biológicas<sup>o</sup>, Laboratorio de Ecofisiología. Apartado Postal F-96, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León C.P. 66450. \* [aquariasxxi@gmail.com](mailto:aquariasxxi@gmail.com)

### RESUMEN:

Se realizaron hidrolizados con restos del fileteado de tilapia utilizando extractos de piña y papaya como fuente de enzimas proteolíticas (bromelina y papaína). Se obtuvieron muestras de los hidrolizados a diferentes tiempos (30 minutos, 1, 24, 48 y 72 horas) eliminando los sólidos por centrifugación. Los péptidos solubles fueron separados mediante precipitación de proteínas con TCA, y la absorbancia a 280 nm del sobrenadante fue utilizada como medida de su concentración. La capacidad antioxidante de los péptidos obtenidos con bromelina y papaína a diferentes tiempos de hidrólisis fue determinada mediante la prueba de ORAC. Los péptidos obtenidos del hidrolizado elaborado a base de cascara de piña mostraron la mayor actividad antioxidante.

### ABSTRACT:

Hydrolysates from byproducts of fish filleting were obtained using pineapple and papaya as a source of proteolytic enzymes (bromelain and papain). Samples from the hydrolysates were obtained at different times (30 minutes, 1, 24, 48 y 72 hours), and all the solids were eliminated through centrifugation. The soluble peptides were separated by precipitating the protein fraction with TCA. Absorbance at 280 nm of the soluble fraction was used as a measure of the peptide concentration. The peptides antioxidant capacity was determined through the ORAC test. Peptides obtained from the pineapple peel showed the highest antioxidant activity.

### Palabras clave:

Hidrolizado de pescado, péptidos antioxidantes, utilización de subproductos.

### Keyword:

Fish hydrolysate, peptides as antioxidants, use of byproducts.

**Área:** Alimentos funcionales

## INTRODUCCIÓN

Actualmente en México se cultiva tilapia en 31 estados de la República, cuya producción se destina principalmente al consumo humano. Tan sólo durante el 2013 la producción de tilapia en México mediante acuicultura fue de 96,827 toneladas y tan solo 5,212 toneladas a través de captura (Sagarpa, 2013). Del procesamiento de tilapia se generan subproductos equivalentes al 35% del peso, los cuales generalmente al no ser aprovechados se convierten en un serio problema económico y ambiental. Derivado de lo anterior, en los últimos años se ha buscado en las industrias acuícola y pesquera una forma de optimizar los subproductos (Beaulieu et al., 2009). Se han utilizado residuos de diferentes especies de pescado para generar hidrolizados de proteínas con propiedades funcionales, entre los cuales se encuentran los arenques (*Clupea sp*) (Hoyle y Merritt, 1994; Sathivel et al., 2003), el capelín (*Mallotus sp*) (Shahidi et al., 1995), la merluza (*Merluccius sp*) (Benjakul y Morrissey, 1997) así como el bacalao (*Gadus morhua*) y el salmón (*Salmo salar*) que son las especies más usadas para este fin (Liaset et al., 2003; Aspino et al., 2005; Slizyte et al., 2005). El uso de hidrolizados es muy diverso y se

han venido empleando como fuente de nitrógeno en dietas entéricas para niños y adultos enfermos (Lebenthal et al., 1983), como ingrediente en cultivos microbianos (Gildberg et al., 1989), como suplemento para aumentar el valor nutritivo de alimentos con bajo contenido proteico y de manera muy extensa en alimentación animal (Shahibi y Venugopal, 1994; Strom y Raa, 1991). La hidrólisis conlleva a la disociación de la estructura primaria de la proteína, y a su fragmentación en péptidos y aminoácidos libres (Rustad, 2013). Estos hidrolizados pueden ser obtenidos mediante métodos químicos o enzimáticos (Li et al., 2010). Dentro de este contexto, la hidrólisis enzimática presentan numerosas ventajas como la selectividad de la enzima utilizada, condiciones moderadas de temperatura y pH, así como la no adición de sustancias extrañas (Bucci y Unlu, 2000). En particular se han usado diversas enzimas con el fin de mejorar las propiedades de hidrolizados de pescado (Sugiyama et al., 1991; Briones-Martínez et al., 1994; Shahidi et al., 1995; Benjakul y Morrissey, 1997). Entre las enzimas vegetales destacan la papaína de la papaya y la bromelaína de la piña (endoproteasas cisteínicas), las cuales han sido utilizadas como ablandadores de carne, para mejorar algunas funcionalidades de proteínas, o para resaltar el sabor de alimentos (Briones-Martínez y Cortés Vázquez, 2008).

Los péptidos provenientes de la hidrólisis de proteínas generan cambios en la molécula tales como: incremento en la carga, exposición de grupos hidrofóbicos y desenmascaramiento de cadenas laterales reactivas de algunos aminoácidos (Caessens et al., 1999). Estas características les confieren propiedades funcionales a algunos péptidos tales como una mayor digestibilidad, hipoalergenicidad y actividad antimicrobiana y/o antioxidante (Van der Ven 2002). Estos péptidos son principalmente secuencias de 3 a 20 aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora. Tras la administración oral, pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos y pueden ejercer su efecto sobre los sistemas cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso, entre otros. El estudio de péptidos antioxidantes ha sido un reto en los últimos años, habiéndose identificado numerosos péptidos que presentan actividad antioxidante en diferentes alimentos. Estos actúan impidiendo que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres que con el resto de las moléculas presentes en un determinado microambiente. Sin embargo, la funcionalidad de los péptidos obtenidos esta influenciada por el grado de hidrólisis, la especificidad de la enzima y las condiciones de hidrólisis. Considerando lo anterior, el proposito del presente trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante de péptidos obtenidos de la hidrólisis de subproductos de tilapia producidos con piña y papaya como fuentes de enzimas.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Elaboración de los extractos enzimáticos:** Se elaboraron extractos de pulpa de piña (PP), de cascara de piña (CP) y extracto de papaya (P). La razón por la que no se incluyó cascara de papaya fue la poca cantidad de material obtenido. Las muestras de frutas se cortaron cubos de aproximadamente 1 cm y se colocaron en un matríz con buffer citratos - fosfatos, pH 5 para piña y cascara de piña y pH 6

para papaya. Posteriormente, se mantuvieron a 4°C durante 24 h y se recuperó la solución de buffer-extracto para ser centrifugada a 14,000 rpm durante 15 min. La concentración de proteína soluble en el extracto enzimático fue determinada mediante el método de Bradford (1976). La actividad proteolítica de los extractos fue evaluada mediante la hidrólisis de caseína 1%, mezclando 0.1ml de extracto enzimático, 0.5ml de buffer correspondiente y 0.5ml de sustrato. La mezcla se incubó durante 30 min a 37°C. Posteriormente se agregó 0.5 ml de TCA al 12% frío y por último se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280nm.

**Elaboración de hidrolizados:** Se colocaron 40 gramos de filete de tilapia en frascos a los cuales se les agregó 20 ml de extracto enzimático y 20 ml de buffer correspondiente para piña o papaya. Los frascos se colocaron en una incubadora a 37°C y se tomó una muestra de 1.5 ml de cada uno de los frascos a los 30 minutos, 1, 24, 48 y 72 horas. Una vez que fue tomada la muestra, se ajustó el pH al valor inicial con ácido Cítrico (0.1 M) o fosfato disódico anhídrido (0.2 M). Las muestras se llevaron a congelación para su posterior análisis. Este procedimiento fue replicado utilizando 20 gramos de fruta (PP, CP y P) en lugar del extracto enzimático y 40 ml de buffer. La concentración de proteína soluble en las muestras de hidrolizados fue determinada mediante el método de Bradford (1976).

**Separación y cuantificación de péptidos:** Para la separación de los péptidos las muestras de hidrolizados fueron mezclados con un volumen igual de ácido tricloroacético al 12% y se mantuvieron a 4°C durante media hora. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm y 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante fue recuperado y se registró la absorbancia a 280 nm para ser utilizada como medida de la concentración de péptidos. En este caso también se determinó la proteína soluble por el método de Bradford (1976).

**Determinación de la capacidad antioxidante:** Las muestras de péptidos solubles obtenidos fueron evaluadas mediante la técnica de ORAC (Huang et al. 2002). El ensayo se realizó en un lector de microplacas Synergy 2 (Biotek) utilizando el radical AAPH y una curva estándar Trolox de 0 a 100  $\mu$ M. La pérdida de fluorescencia de la fluoresceína (485 nm de excitación y 528 nm de emisión) fue registrada cada minuto y los cálculos del área bajo la curva fueron realizados con el software Gen5 (Biotek). La capacidad antioxidante de las muestras fue expresada como equivalentes de Trolox ( $\mu$ M).

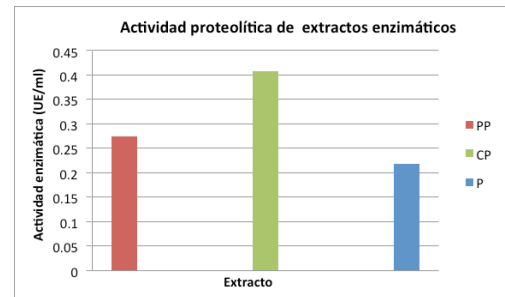
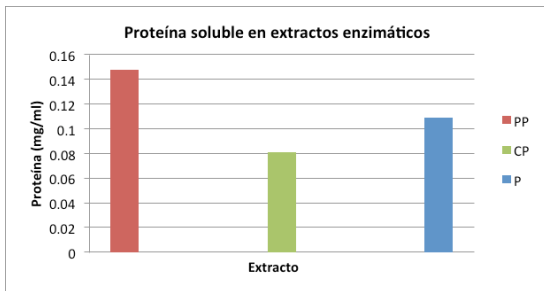
Todos los análisis se realizaron por triplicado y en las figuras solo se presentan las medias de cada determinación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Extractos enzimáticos

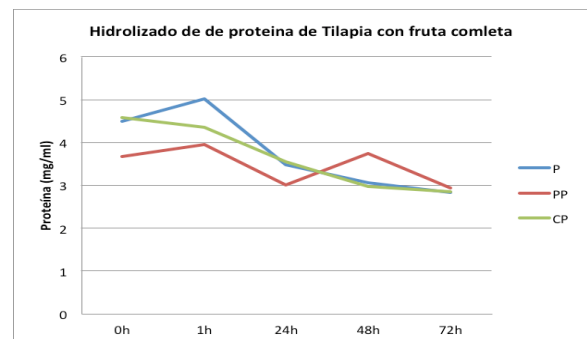
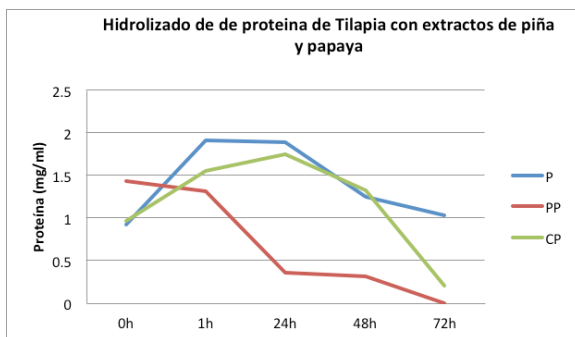
La mayor extracción de proteína se obtuvo con la pulpa de piña, seguida de la papaya y la cascara de piña. Sin embargo, la mayor actividad enzimática proteolítica

se obtuvo con el extracto de cascara de piña, seguido por la pulpa de piña y la papaya.



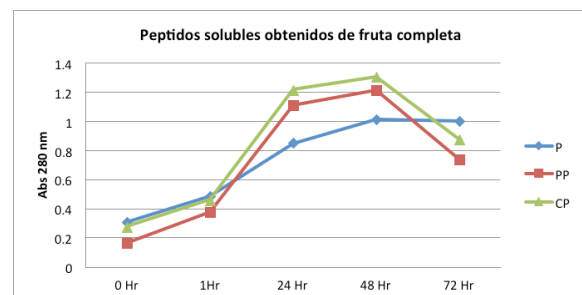
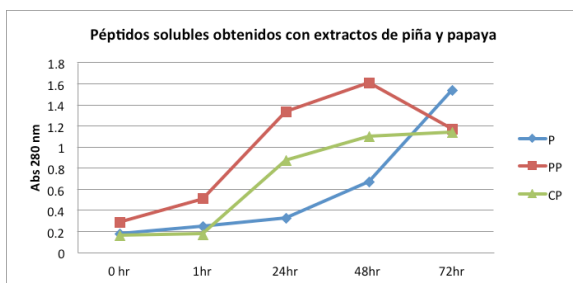
### Hidrolizados

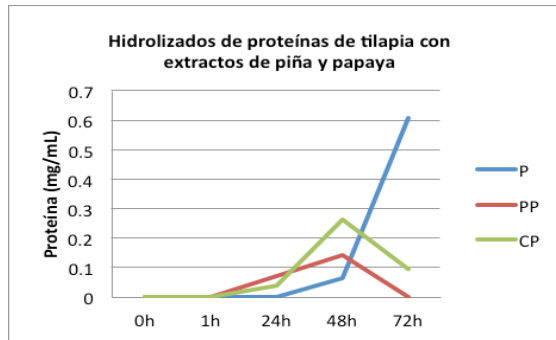
Los hidrolizados de tilapia producidos con fruta completa presentaron mayor concentración de proteína soluble comparados con los producidos con extractos enzimáticos y en ambos casos los producidos con papaya presentaron los valores más altos.



### Péptidos solubles

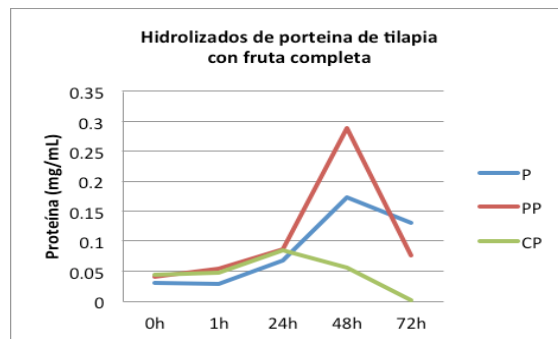
Los péptidos solubles obtenidos con extractos enzimáticos de pulpa y cascara de piña se incrementaron principalmente entre las 24 y 48 h de hidrólisis, mientras que los obtenidos con extracto de papaya se incrementó gradualmente con un máximo a las 72 h. Cuando se utilizó fruta completa el resultado fue similar con los tres hidrolizados, con valores máximos entre 24 y 48 h de hidrolisis.





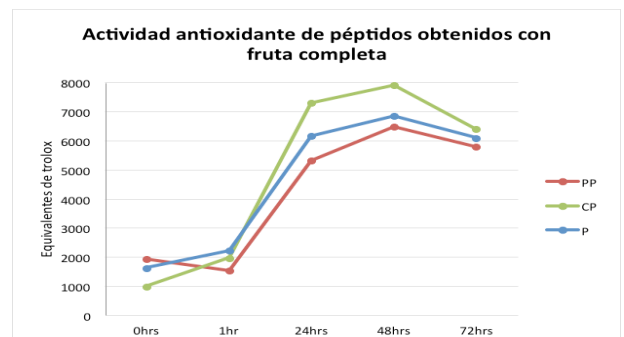
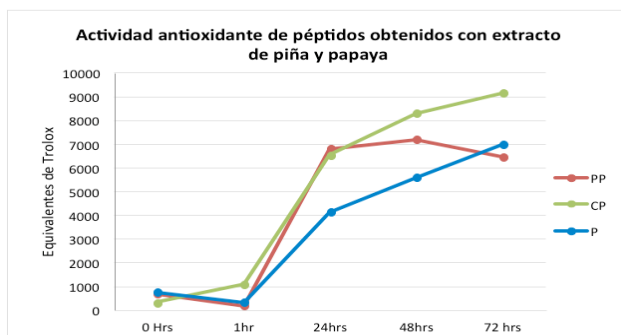
La concentración de los péptidos

de proteína soluble en los péptidos solubles obtenidos a partir de extractos enzimáticos de frutas fue mayor con la papaya (P) a las 72 h. Mientras que con pulpa de piña (PP) y cascara de piña (CP) se incrementó hasta las 48 horas y disminuyó a las 72 h. Cuando se utilizó fruta completa, la mayor concentración de proteína se obtuvo a las 48 h con pulpa de piña, seguido por los hidrolizados con papaya, mientras que con la cascara de piña el mayor pico se presentó a las 24 h. En todos los casos las variaciones en la concentración de proteína podría estar más relacionada con la afinidad entre el reactivo de Bradford y la estructura de los péptidos en cada muestra.



### Capacidad Antioxidante de los péptidos solubles

En todas las muestras de péptidos solubles se obtuvo un incremento de la capacidad antioxidante a las 24 horas de hidrólisis. Los péptidos obtenidos con extracto de cascara de piña a las 72 y 48 h presentaron la mayor capacidad antioxidante. Cuando se utilizó fruta completa, igualmente, los péptidos obtenidos de cascara de piña presentaron mayor actividad antioxidante, pero en este caso fue a las 48 y 24 h.



Las figuras de concentración de péptidos solubles y de actividad antioxidante presentan patrones generales muy similares, indicando una relación entre la cantidad de péptidos y la actividad antioxidante.

## CONCLUSIONES

Es factible la elaboración de hidrolizados a partir de subproductos de tilapia utilizando papaya o piña como fuentes de papaína o bromelaína. Se comprobó que los hidrolizados contienen péptidos bioactivos con capacidad antioxidante. El tiempo de hidrólisis para la mayor generación de péptidos se observó entre las 24 y 48 h a 37°C. Los péptidos con mayor actividad antioxidante fueron los producidos con cascara de piña. La siguiente etapa de este trabajo será evaluar la funcionalidad de los péptidos en bioensayos con animales.

## BIBLIOGRAFÍA

- Briones-Martínez R. y Cortés-Vázquez M.I. 2008. Proteasas vegetales en alimentos. Rev. Latinoamericana Énfasis Alimentación. 9:70-74
- Bucci, L. R. y L. Unlu, 2002. Protein and aminoacids complements in exercise and sport. En Wonlisky, I., J. A.
- Bradford, M. 1976. A Rapid Sensitive Method for Qunatitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding. Anal. Biochemistry. 72, 248-254
- Drinskell y F. L. Boca Raton (Eds), energy yielding macronutrients and energy metabolism in sport nutrition. FL: CRC Press: 191-212
- Caessens, P. W. J. R, W.F. Daamen, H. Gruppen, S. Visser y A. G. J. Voragen, 1999.  $\beta$ - lactoglobulin hydrolysis. II Peptide identification, SH/SS exchange, and functional properties of hydrolysate fractions formed by the action of plasmid. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 47: 20980-2990
- Espe, M., Lied E. y K. R. Torrissen, 1993. Changes in plasma and muscle amino acids in Atlantic salmon (Salmon salar) during absortion of diets containing different amounts of hydrolysed cod muscle protein. Comp Biochem Physiol A, 105: 555-562
- Garibay M., Rodolfo Q. R., Agustín,L.,1993. Biotecnología alimentaria. Editorial Limusa. 281-283 pp.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., and Prior, R. 2002 High throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96 Well Format. J. Agric. Food Chem. 50:4437-4444.
- Lehninger A.I., Nelson D.L y Cox M.M. 2005 Principios de bioquímica. 4° edición. Editorial Omega, S.A.
- Li, Z.-Y., W. Youravong y A. H.-Kittikun, 2010. Protein hydrolysis by protease isolated from tuna spleen by membrane filtration: A comparative study with commercial proteases. Food Science and Technology, 43: 166-172.
- Mackie I.M. 1982. Fish protein hydrolysates. Process Biochem., 31:26-28

- Nilsang, S., S. Lertsiri, M. Suphatharika y A. Assavaning. 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrated by commercial proteases. *Journal of food engineering*, 70: 571-578
- Palma, J. M., Sandalio L. M. , Corpas F. J., Romero-Puertas M. C. , McCarthy I. y Del Rio L. A. 2002. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *PlantPhysiolBiochem*. 40:521–30.
- Rustad, T., 2003. Utilization of marine by-products. *Electric Journal of Enviromental, Agriculture and Food Chemistry*, 2: 458-463.
- Van der Ven, C., 2002. Biochemical and functional characterization of casein and whey protein hydrolysates. A study on the correlations between biochemical and functional properties using multivariate data analysis. Wageningen University. The Netherlands. 170 pp.
- Walsh, G, 2002. *Proteins, Biochemistry and Biotechnology*. West Sussex, England: John Wiley and Sons Ltd.; 420 pp
- Yúfera, P. 1979. *Química Agrícola II Alimentos*. ES. Alhambra. p. 240-249.