

**PL-05: ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA DE UN HIDROLIZADO DE LACTOSUERO DE CABRA CON PROTEASA DE *ASPERGILLUS ORYZAE*.**

C. Alvarado-Carrasco<sup>1\*</sup>, J. Gómez-Ruiz<sup>2</sup>, M. Guerra<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias, Estado Aragua.

<sup>2</sup>Instituto de Investigación en Ciencias de Alimentación (CIAL), Campus de Cantoblanco, Madrid, España.<sup>3</sup>Universidad Simón Bolívar, Departamento de Procesos Biológicos y Bioquímicos, Valle de Sartenejas, Estado Miranda.

\*Autor para la correspondencia e-mail: alvarado1959@yahoo.com

**Angiotensin-converting Enzyme Inhibitory Activity of Goat Whey Hydrolyzed with *Aspergillus Oryzae* Protease.**

**Abstract.** The purpose of this research was to determine the inhibitory activity of the Angiotensin-converting enzyme (ACE) of a goat whey hydrolysate obtained by application of an *Aspergillus oryzae* protease/peptidase complex (Flavourzyme™). Goat cheese whey was hydrolyzed under controlled conditions, considering two variables: whey protein concentration method (ultrafiltration and thermo-coagulation) and inclusion or not of an acid lactic bacteria in the enzymatic treatment. Hydrolysate derived from the combined action of acid lactic bacteria and the protease on the thermo-coagulated whey proteins showed the largest ACE inhibitory activity. It is concluded that this technique might allow using goat whey as a functional ingredient in the prevention of hypertension.

**Key words:** goat whey, *Aspergillus oryzae*, angiotensin-converting enzyme

**Resumen.** El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad inhibidora de la Enzima Convertidora de la Angiotensina (ECA) de un hidrolizado de lactosuero de queso de cabra obtenido con la aplicación de un complejo proteasa/peptidasa de *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme™). El lactosuero de una producción de queso de cabra se sometió a hidrólisis bajo condiciones controladas, considerando dos variables: tipo de concentración de las proteínas del suero (ultrafiltración y termocoagulación) e incorporación o no de una bacteria ácido láctica al proceso enzimático. La mayor actividad inhibidora de la ECA se obtuvo concentrando las proteínas por termocoagulación y aplicando una combinación de la proteasa con una cepa ácido-láctica. Se concluye que ésta técnica podría permitir el aprovechamiento del lactosuero caprino como ingrediente funcional para la prevención de la hipertensión.

**Palabras clave:** lactosuero caprino, *Aspergillus oryzae*, enzima convertidora de la angiotensina

## 1 Introducción

Durante los últimos años, numerosos estudios se han enfocado en el aprovechamiento del lactosuero normalmente desechado de la producción quesera, para transformarlo en un ingrediente funcional de alto valor agregado (Chatterton *et al.*, 2006). Las proteínas del lactosuero han sido reconocidas como una importante fuente de péptidos bioactivos (Hernández-Ledesma *et al.*, 2002), los cuales son liberados mediante una hidrólisis enzimática moderada (grado de hidrólisis <20%), bajo un cuidadoso control de las principales variables que condicionan la actividad de la enzima empleada, tales como pH, temperatura, relación enzima-sustrato (E/S) y tiempo (Guo *et al.*, 2009). Debido al elevado contenido de agua del lactosuero

(>90%), se hace necesario la concentración de las proteínas previo al proceso de hidrólisis. Dos de los procesos de concentración normalmente empleados en la industria láctea son la Ultrafiltración por membrana y la Termocoagulación por desnaturalización térmica de las proteínas. Por otra parte, Tsai *et al.* (2008) señalaron que se pueden obtener péptidos con actividad antihipertensiva gracias a la acción conjunta de una proteasa y una cepa ácido-láctica.

## 2 Materiales y métodos

Se utilizaron lotes de lactosuero de la producción de queso de cabra de la planta piloto de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela, campus Maracay. Previo a la hidrólisis, cada lote de lactosuero se dividió en dos porciones, una se concentró por ultrafiltración (UF) siguiendo procedimiento descrito por Quirós (2007) mediante celda con agitación (Millipore modelo 8400, de Millipore Corporation, Bedford, MA, EEUU). La segunda porción se concentró por termocoagulación se siguió el procedimiento descrito por Ramirez y Rivas (2003), calentando hasta 85°C para desnaturalizar la proteína y luego recolectar los sólidos por filtración.

Las condiciones óptimas, para obtener un grado de hidrólisis entre 10 y 20%, se determinaron mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR) con diseño central compuesto 2<sup>4</sup>: 16 corridas centrales, 8 corridas axiales y 7 corridas de punto central, con dos réplicas de cada uno, para un total de 93 experimentos. El grado de hidrólisis (DH) se midió por la técnica de pH-stat descrito por Li-jun *et al.* (2008).

Bajo estas condiciones se hidrolizaron los concentrados de lactosuero, en cuatro tratamientos diferentes, resultantes de la combinación de dos variables: tipo de concentración de las proteínas del suero (ultrafiltración y termocoagulación) e incorporación o no de una bacteria ácido láctica (una mezcla de cultivos termófilo de *L. helveticus* y *St. Salivarius* var *thermophilus*, FD-DVS-TCC-20 de Chr. Hansen, Biotécnica Catalina, Venezuela) en una proporción de 0,02%. Los cuatro hidrolizados y sus réplicas se ultrafiltraron, para obtener las fracciones con sólidos de un tamaño menor a los 3 kDa (permeado resultante del proceso de UF). Estas fracciones se liofilizaron y se mantuvieron congeladas a -20°C hasta el momento de su uso.

La actividad antihipertensiva de un hidrolizado se puede estimar *in vitro* midiendo el grado de inhibición de la actividad de la enzima ECA; para esto se aplicó el protocolo descrito por Sentandreu y Toldrá (2006) utilizando un lector de fluorescencia en microplaca de 96 pocillos FLUOstar OPTIMA (BMG Labtechnologies GmbH, Offengurg, Alemania) para medir la fluorescencia generada cuando la enzima ECA corta los dos aminoácidos C-terminales del tripéptido O-aminobenzoilglicil-p-nitro-L-fenilalanil-L-prolina. La cantidad de péptido que reduce en un 50% la fluorescencia generada (IC<sub>50</sub>) se expresa en µg/g.

Los resultados se evaluaron mediante prueba no-paramétrica de Kruskal-Wallis utilizando programa estadístico Statistica 7.0 (Stat Soft, Tulsa, EEUU) con una prueba de medias de X<sup>2</sup>.

## 3 Resultados y discusión

Las condiciones de hidrólisis seleccionadas a partir de un análisis de superficie de respuesta fueron: pH 7, temperatura 34°C, relación Enzima/Sustrato 3% y tiempo de incubación 150 minutos. Al mantener estas condiciones de hidrólisis en los cuatro tratamientos propuestos en el presente trabajo, se obtuvieron cuatro hidrolizados cuyas fracciones menores a 3 kDa mostraron todas tener actividad inhibidora de la enzima ECA (Cuadro 1).

El análisis estadístico demostró que el método de concentración no afecta la actividad inhibidora de la enzima ECA de los hidrolizados, mientras que la forma de aplicación del tratamiento enzimático sí tiene un efecto significativo sobre esa actividad. La acción conjunta de la enzima y la cepa ácido-láctica mostró una mayor ( $p=0,0039$ ) actividad inhibidora de la enzima ECA que cuando los hidrolizados se obtuvieron solo por la acción de la enzima. Esto coincide con lo señalado por Tsai *et al.* (2008) de que la combinación de la fermentación ácido-láctica con la hidrólisis mediante Flavourzyme® acelera la producción de péptidos bioactivos con actividad inhibidora de la enzima ECA, y que por tanto, ésta técnica podría hacer del lactosuero un ingrediente útil en alimentos fisiológicamente funcionales para la prevención de la hipertensión arterial.

Cuadro 1. Actividad inhibidora de la Enzima Convertidora de la Angiotensina de los hidrolizados de lactosuero caprino bajo cuatro tratamientos, expresada como  $IC_{50}$  en  $\mu\text{g/g}$

Tratamiento	Resultados	
	$\bar{X}$	E.T.
Ultrafiltración+Enzima+Cepa Ácido Láctica	10,78	$\pm 0,18^a$
Ultrafiltración+Enzima	87,98	$\pm 4,48^b$
Termocoagulación+Enzima+Cepa Ácido Láctica	10,54	$\pm 0,72^a$
Termocoagulación+Enzima	66,18	$\pm 4,48^b$

Valores con superíndices diferentes difieren estadísticamente con  $P < 0,01$

#### 4 Conclusión

Se concluye que la fermentación ácido-láctica asistida por la proteasa de *A. oryzae* podría permitir el aprovechamiento del lactosuero caprino como ingrediente funcional para la prevención de la hipertensión arterial.

#### 5 Agradecimiento

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela por el financiamiento del proyecto de investigación a través del convenio CDCH-PG-11-7132-2008/1, del cual se derivó éste trabajo.

#### 6 Literatura Citada

- Chatterton, D., G. Smithers, P. Roupas and A. Brodkorb. 2006. Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin - technological implications for processing. *Int. Dairy J.* 16, 1229-1240.
- Guo, Y., D. Pan and M. Tanokura. 2009. Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology. *Food Chemistry.* 114, 328-333.

- Hernández-Ledesma, B., I. Recio, M. Ramos and L. Amigo. 2002. Preparation of ovine and caprine  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *Int. Dairy J.* 12, 805-812.
- Li-jun, L., Z. Chuan-he and Z. Zheng. 2008. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. *Food Bioprod. Proc.* 86, 1-6.
- Quirós, A. 2007. *Leches fermentadas con actividad antihipertensiva: identificación de péptidos y evaluación de su biodisponibilidad*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.
- Ramirez, A., y N. Rivas. 2003. Producción y caracterización parcial de beta-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* propagada en suero de leche. *Anales Lat. de Nutrición* , 53 (2), 194-201.
- Sentandreu, M., and F. Toldrá. 2006. A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nature Protocols.* 1 (5), 2423-2427.
- Tsai, J., T. Chen, B. Pan, S. Gong and M. Chung. 2008. Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. *Food Chem.* 106, 552-558