

Proteólisis endógena de la carne de cerdo como alternativa en la producción de péptidos bioactivos

H.M García, D. Torres y R. García

H.M García, D. Torres & R. García
Universidad Politécnica de Tlaxcala ,Laboratorio de Procesos Biotecnológicos,. Av. Universidad Politécnica No. 1, San Pedro Xalcaltzinco, Tlax., México C.P. 90180
raquel.garcia@uptlax.edu.mx

M. Ramos.,V.Aguilera.,(eds.). Ciencias Administrativas y Sociales, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2013.

Abstract

Peptides have been characterized by be molecules with biological activity, many of them are obtained from enzymatic hydrolysis induced, however food systems such as the meat has an endogenous proteolytic systems which can generate peptides with biological importance, however of this food are not many reports. The objective of this work was to study the activity of the endogenous enzymes of the meat pork, to obtain peptides from the myofibrillar proteins and to evaluate their biological activity. The enzyme activity it was determined according to the pH of action of the endogenous enzymes, we found 3 values of pH with high activity. On the other hand, the myofibrillar proteins and peptides were isolated molecular of weight minor than or equal to 10 kDa. We quantified the antioxidant activity equivalent to trolox and the percentage of inhibition of oxidation. The results obtained showed that the peptides of myofibrillar proteins had antioxidant activity

31 Introducción

En el proceso bioquímico de conversión del músculo a carne se ven involucradas diversas reacciones, siendo las más importantes las que son realizadas por enzimas proteolíticas, principalmente las encontradas en los lisosomas y en el citosol, ya que se han enumerado diversos reportes en los cuales estos dos sistemas proteolíticos son fundamentalmente para obtener una carne con una calidad de textura agradable al consumidor. (Lawrie, 2006)

Existen diferentes teorías las cuales sugieren el tipo de sistema proteolítico que está involucrado en el ablandamiento de la carne, unos autores referencian y dirigen sus investigaciones hacia las enzimas encontradas en los lisosomas y reportan que son las más importantes en este proceso, sin embargo otra corriente de autores sugiere que las enzimas citosólicas son las que tienen la prioridad. Por otro lado una tercera teoría sugiere que es necesario la acción de los dos tipos de enzimas, ya que su acción se origina en dos etapas bioquímicas en la conversión del músculo a carne (Cheret, Delbarre-Ladrat, Lamballerie-Anton & Verrez-Bagnis, 2007, McAfee et al 2010).

La cuarta teoría sugiere que el grupo catalítico conformado por el sistema llamado proteosoma también se ve involucrado en el ablandamiento de la carne (Toldrá, 2012). Sin embargo el presente trabajo se basará principalmente en el estudio de los dos primeros sistemas proteolíticos. Un sistema proteolítico es un grupo de proteasas las cuales son moléculas de origen proteico y que tiene como finalidad romper enlaces de una proteína, y reducir así su tamaño, a cadenas polipeptídicas o incluso péptidos.

En la carne se encuentran sistemas proteolíticos que actúan sobre ella, dando como resultado una calidad textural adecuada que sea reconocida por el consumidor. El primer sistema proteolítico, involucra a las enzimas que se encuentran en los lisosomas, encontrando en éstas a las denominadas catepsinas.

Estas enzimas son liberadas de los lisosomas debido al rompimiento de la membrana lipoproteínica y, como consecuencia de los valores bajos de pH alcanzados después de la muerte del animal. Las catepsinas tienen un pH óptimo ácido (Lawrie, 2006), solo 8 se han demostrado existentes en los lisosomas de la célula del músculo: A, B, C, D, H, L y J, siendo las catepsinas B, D, H y L las mejor caracterizadas. El otro sistema catalítico es el conformado por las calpainas, también llamadas enzimas activadas por calcio, proteasas neutras activadas por calcio o proteasas dependientes de calcio, ya que para que éstas sean activadas se necesitan valores específicos de calcio, están se encuentran en el citosol de la célula muscular y dispone de la concentración de calcio encontrado en el retículo endoplásmico. Tanto las catepsinas como las calpainas, degradan proteínas las cuales se encuentran aproximadamente en un 70% de peso seco de la carne, es decir son el componente mayoritario en cualquier sistema cárnico.

Las proteínas encontradas en la carne se encuentran clasificadas de acuerdo a su solubilidad, siendo éstas, sarcoplásmicas (solubles en agua), las miofibrilares (solubles en soluciones de mediana fuerza iónica) y las conectivas (insolubles), de estos tres grupos el más importante son las miofibrilares ya que ellas ocupan el componente mayoritario del contenido total de proteína. Si estas proteínas miofibrilares son degradadas para poder ofrecer un ablandamiento en la carne, debido a su degradación, podemos decir que la acción de estas favorecería la producción de péptidos, los cuales son uniones de aminoácidos, que a su vez son la unidad fundamental de una proteína.

El estudio de los péptidos derivados de alimentos han tenido un gran interés en la última década, debido a que se ha observado que algunos pueden presentar actividad biológica. es decir que tienen la capacidad de aportar un beneficio en la salud, en algunos casos se ha observado que contrarrestan y evitan algunas enfermedades (Roy, Boye & Simpson 2010). Los péptidos se caracterizan por tener actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, antihipertensiva, antifúngica, anticancerígena, hipercolesterolémica entre otras. Los péptidos más estudiados son los derivados de la soya, leche y del huevo (Gibbs, Zougman., Masse & Mulligan 2004, Roy et al 2010), y los de la carne han sido poco estudiados.

El presente trabajo tuvo como objetivo, estudiar la proteólisis endógena de la carne y evaluar la actividad antioxidante que presentan los péptidos derivados de las proteínas miofibrilares.

31.1 Método

Se utilizaron muestras del músculo Longissimus dorsi de cerdo, el cual se obtuvo de un lugar cercano al laboratorio de trabajo, en el Estado de Tlaxcala; 24 hrs después del sacrificio y fue transportado y almacenado a 4°C hasta su uso, no se tienen reportes de sexo y edad del animal. Obtención de extracto enzimático endógeno de la carne de cerdo: El músculo se homogenizó con un amortiguador de fosfatos pH 7, se centrifugó a baja temperatura para evitar la desnaturalización y pérdida de actividad de las enzimas; el sobrenadante contenía las proteasas.

Sustratos: Las proteasas endógenas se analizaron según su pH de actividad: ácida, neutra y básica. Los sustratos utilizados fueron la hemoglobina en el análisis a pH ácidos y la caseína a pH neutros y básicos, estos fueron preparados según Ouali y Valin (1980).

Evaluación de la actividad enzimática: Se determinó mediante una reacción con 0.25 mL de extracto y 1 mL del respectivo sustrato y se incubaron a 37°C, durante 10 minutos, (aproximadamente 1.37 mg de proteína). La reacción se detuvo con 3 mL de ácido tricloroacético al 5%, se centrifugó y se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm en un espectrofotómetro Cary 300 Bio UV-Visible.

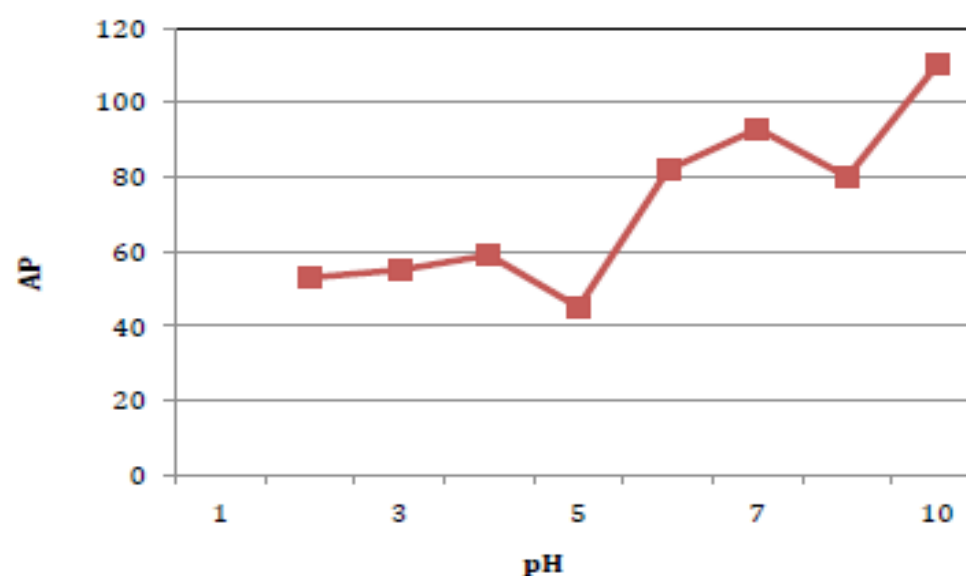
Extracción de péptidos de proteínas miofibrilares: Las proteínas miofibrilares fueron extraídas de acuerdo a la metodología propuesta por Ngapo (1999), homogenizando la carne con agua, posteriormente se mantuvo en un baño de hielo con agitación y posteriormente se centrifugó a 4,000 rpm a baja temperatura, para evitar así la desnaturalización de éstas. Las proteínas miofibrilares contenidas en el precipitado se resuspendieron en un buffer de fosfatos a pH 7. Posteriormente este extracto de proteínas miofibrilares fueron separadas por peso molecular por ultrafiltración por medio de una celda amicon de corte molecular de 10 kDa, centrifugándose a las mismas condiciones que las proteínas. El líquido encontrado en el fondo de la celda contenía los péptidos de proteínas miofibrilares, y se cuantificó el contenido de residuos proteicos mediante el método de Biuret (Gornall,1949).

Determinación de la actividad antioxidante: La actividad antioxidante se determinó mediante el método del ABTS (Re, Pellegrini, Prottegente, Yang & Rice-Evens, 1999), formando el radical libre, el cual es obtenido debido a la reacción del ABTS a una concentración de 7mM con persulfato de sodio a 2.45 mM, esta reacción tuvo una duración de 16 hrs. Se realizó una curva patrón con un antioxidante sintético en este caso se utilizó el Trolox, los resultados fueron expresados en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox), mientras que el porcentaje de inhibición fue determinado de acuerdo a Thapiong, Boonprakob, Crosby, Cisneros & Hawkins (2006).

Todos los análisis se realizaron por triplicado, y fueron analizados estadísticamente mediante una t de Student mediante el software SAS.

31.2 Resultados

Al realizar la determinación de la actividad enzimática se encontraron diferencias entre las actividades de las proteasas con actividad ácida y básica. En la figura 1, se observa que la actividad enzimática con valores de pH ácido presenta la menor actividad (2-4) que a valores de pH de (6-10). Se observó que el valor de pH con mayor actividad ácida fue de 4, mientras los valores con mayor actividad básica neutra fue a los 6 y 7 ($P<0.05$). Lo anterior propone que la hidrólisis de las proteínas miofibrilares se ve favorecida hacia las enzimas con actividad neutra-básica que hacia las que tienen actividad ácida, siendo esto 83 y 95 UAP a pH de 6 y 7 ($P<0.05$) y 55 UAP para pH 4.

Figura 31 Valores de pH óptimo de Actividad enzimática

Cuando se aislaron las proteínas miofibrilares, y subsecuentemente los péptidos por peso molecular, se determinó la concentración de materia de origen proteico y se observó que las proteínas tenían una concentración de 10.78 mg/ml mientras la concentración de extracto de péptidos fue de 1.53 mg/mL, lo que significa que el sistema miofibrilar contiene cerca del 14.23% de péptidos, en esta muestra. Al extracto de péptidos se le determinó la actividad antioxidante, por el método del ABTS, encontrando valores de 5.4% de inhibición de la oxidación, mientras que la actividad antioxidante en TEAC fue de 39.58 μ moles equivalentes a TROLOX.

31.3. Discusión

La carne inicialmente tuvo un valor de pH de 6.5, encontrándose muy cercano a la neutralidad, lo que sugiere que enzimas con actividad neutra-básica actúan en el sistema natural de la carne. Los resultados muestran que los péptidos resultantes de la actividad enzimática endógena de la carne, por acción de enzimas con actividad ácida y básica presentan una actividad inhibición de la oxidación la cual fue de aproximadamente 40 μ moles de trolox.

31.4 Conclusiones

Los resultados mostraron evidencia de que los péptidos derivados de una proteólisis no inducida, presentan actividad antioxidante, debido a la acción en conjunto de las enzimas endógenas de la carne con acción ácida-neutra-básica. Por lo que se sugiere que los alimentos derivados de cárnicos podrían contribuir a beneficio a la salud por acción de los péptidos miofibrilares. El presente trabajo contribuyó a la investigación básica del estudio de bioactividad en sistemas cárnicos ya que no existen muchos estudios en este alimento, la parte complementaria de este trabajo es estudiar sobre productos cárnicos procesados.

31.5 Referencias

Cheret, R., Delbarre-Ladrat, C., Lamballerie-Anton M. & Verrez-Bagnis V. (2007).

Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. Food Chemistry, 101(4),1474-1479.

Gibbs B., Zougman A., Masse R. & Mulligan C. (2004). Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food.

Food Research International, 37,123–131.

Gornall A. J., Bardawill C. J. & David M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177,751-766

Lawrie, R.A. & Ledward, D.A., (2006). *Lawrie's Meat Science*, Woodhouse Publishers, Cambridge, UK.

Mcafee, A., J. McSorley E.M. Cuskelly, G. J., Moss, B.W., Wallace, J. M., Bonham, M,

P, & Fearon A.M. (2010). Red meat consumption: An overview of the risks and benefits. *Meat Science*, 84, 1-13

Ngapo, T.M., Babare, I.H., Reynolds, J., & Mawson, R.F. (1999). A preliminary investigation of the effects of frozen storage on samples of pork. *Meat Science*, 53,169-177

Ouali A. (1992). Proteolytic and physiological mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie*, 74, 251-265.

Re, R., Pellegrini, N., Prottegente A., Yang, M. & Rice-Evens, C. (1999). Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical*

Biology and Medicine, 26,1231-1237.

Roy F., Boye J. & Simpson B. (2010). Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International*, 43,432-442.

Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros L. & Hawkins, B.D. (2006).

Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669-675.

Toldrá L, F. (2006). *Meat: Chemistry and Biochemistry*. En: Y.H. Hui, J.D. Culbertson,

S. Duncan, I. Guerrero-Legarreta, E.C.Y. Li-Chan, C.Y. Ma, C.H. Manley, T.A. McMeekin, W.K. Nip, L.M.L. Nollet, M.S. Rahman, F. Toldrá AL, Y.L. Xiong, (Eds), *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Boca Raton, FL. CRC Press,