

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEINAS

Las proteasas catalizan la degradación hidrolítica de las cadenas polipeptídicas produciendo un cambio en la estructura primaria.

Ventajas:

Ocurren bajo condiciones suaves a temperatura ambiente

Las enzimas no son tóxicas por lo cuál no hay que removerlas al finalizar la hidrólisis

No se forman productos laterales

Desventajas: Costo de las enzimas

Grado de hidrólisis (GH o DH):

Es una medida cuantitativa de la extensión de la hidrólisis

Hidrólisis extensiva hasta el nivel de péptidos pequeños y aac (PM < 5000 Da)

Inconvenientes: Formación de péptidos amargos, asociados a un alto contenido de aac hidrofóbicos

Hidrólisis parcial o controlada:

Se logra por

monitoreo del GH,

uso de proteasas específicas

ultrafiltración.

Ventajas: Ausencia de péptidos amargos.

Aplicaciones: Mejoramiento de propiedades funcionales de concentrados y aislados proteicos (Solubilidad, propiedades de interfase) para aplicación en salsas, sopas, agentes de batido y emulsificación)

Métodos par eliminar el sabor amargo: Utlización de exopeptidasa, remoción selectiva de aac y péptidos amargos por adsorción en carbón activado, enmascaramiento utilizando p.ej. ácidos orgánicos.

Aislado proteico de lupino

HPLA: Alcalasa
(endopeptidasa)

HPLF:

Flavourzyme
(exopeptidasa)

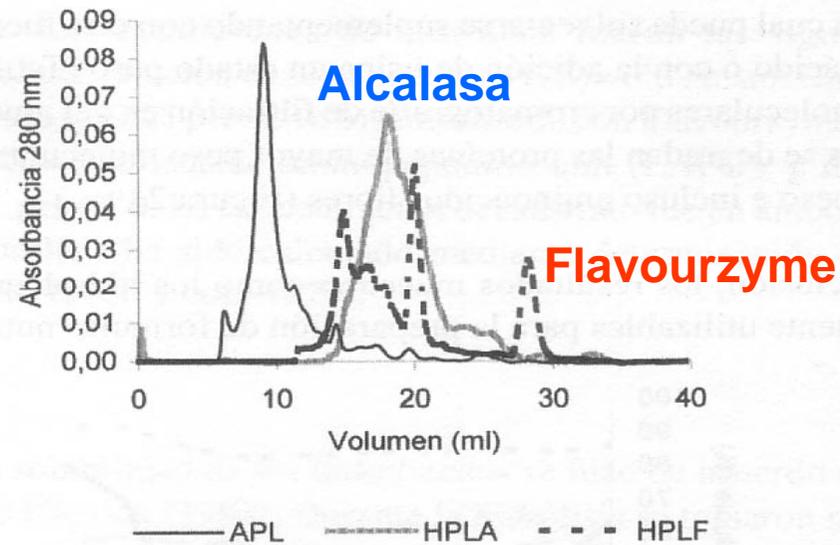


FIGURA 2. Cromatogramas de filtración en gel de los hidrolizados obtenidos.

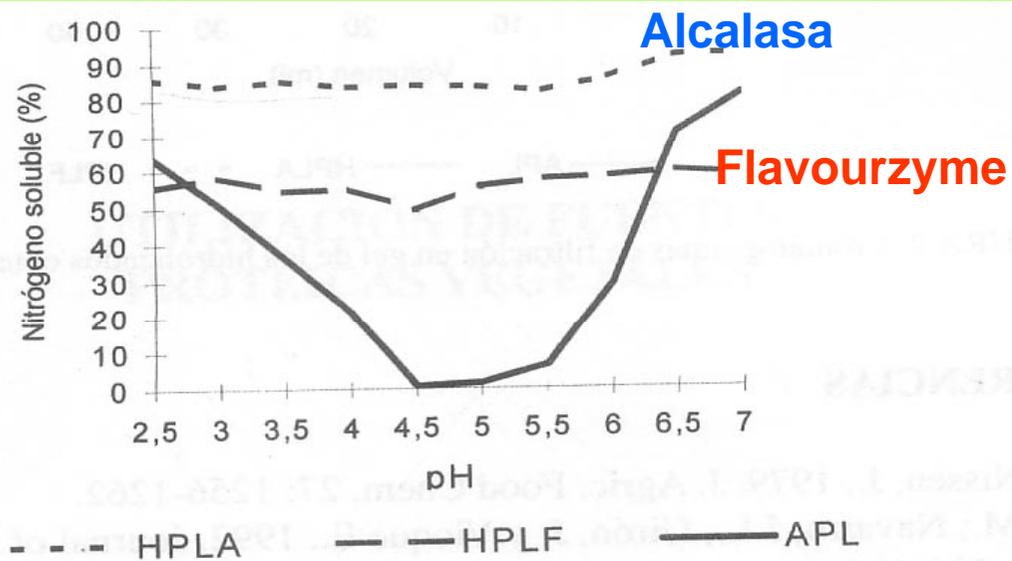


FIGURA 1. Curvas de solubilidad de los hidrolizados obtenidos.

Parámetros de hidrólisis

Concentración de sustrato (proteína)

Relación enzima/sustrato

pH

Temperatura

Tiempo

PROCESAMIENTO DE HIDROLIZADOS ENZIMATICOS

Selección de la materia prima

Selección de la enzima

Selección de las condiciones de hidrólisis

Selección del método de inactivación de la enzima

Separación (si es necesario)

Post-tratamiento para eliminación de sabores amargos

Concentración Secado

Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates

Efecto del tipo de enzima

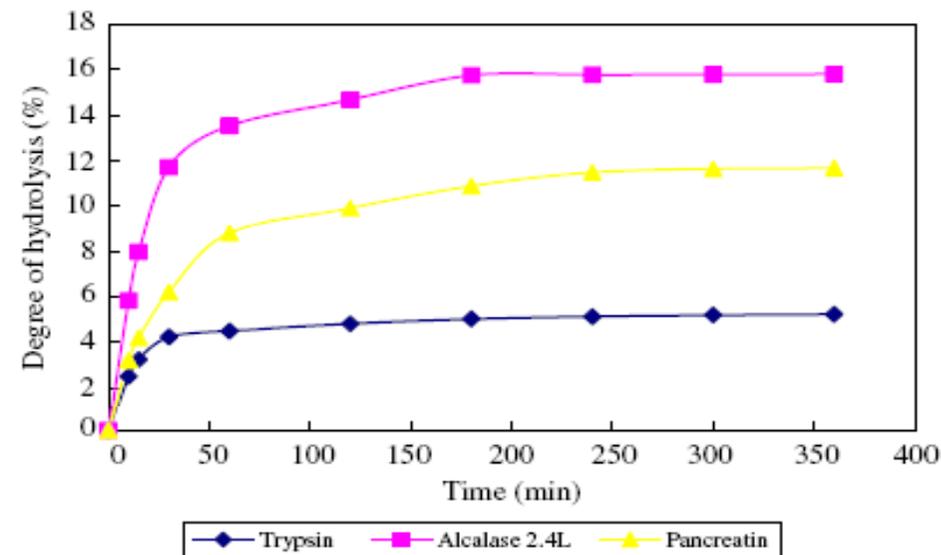


Fig. 1. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten with different proteases at 1:100 (w/w) enzyme/substrate and wheat gluten concentrations at 5%.

Conditions for the hydrolysis of wheat gluten with different proteases

Reaction conditions	Proteases			
	Alcalase 2.4L	PTN 6.0S	Pepsin	Pancreatin
pH	8.5	8.5	2.0	8.5
T (°C)	60	47	37	37

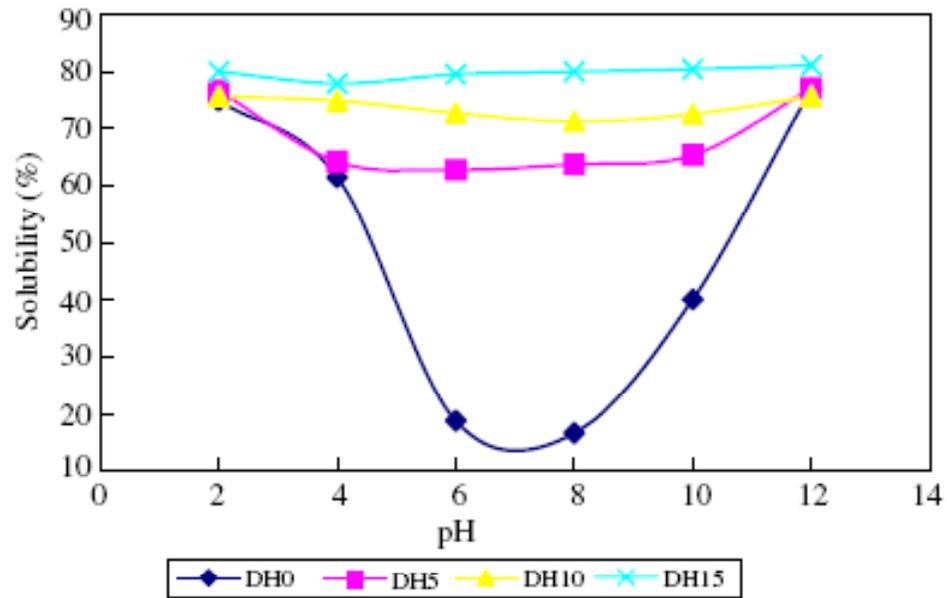


Fig. 4. Effect of pH on solubility profiles of AWGHs with different DH.

Emulsion capacity: EC
Emulsion stability: ES

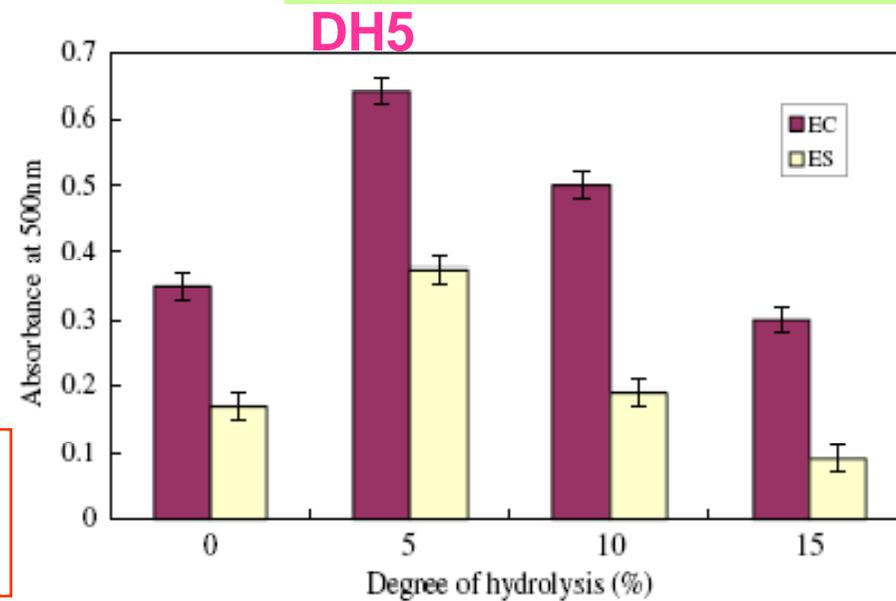


Fig. 5. Emulsifying properties of AWGHs with different DH.

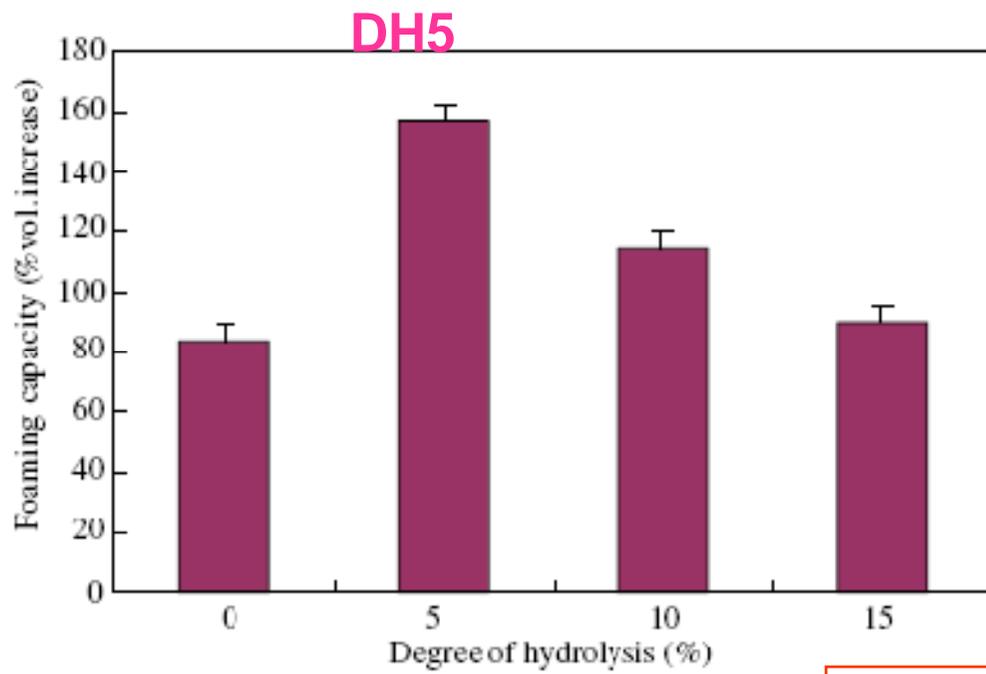
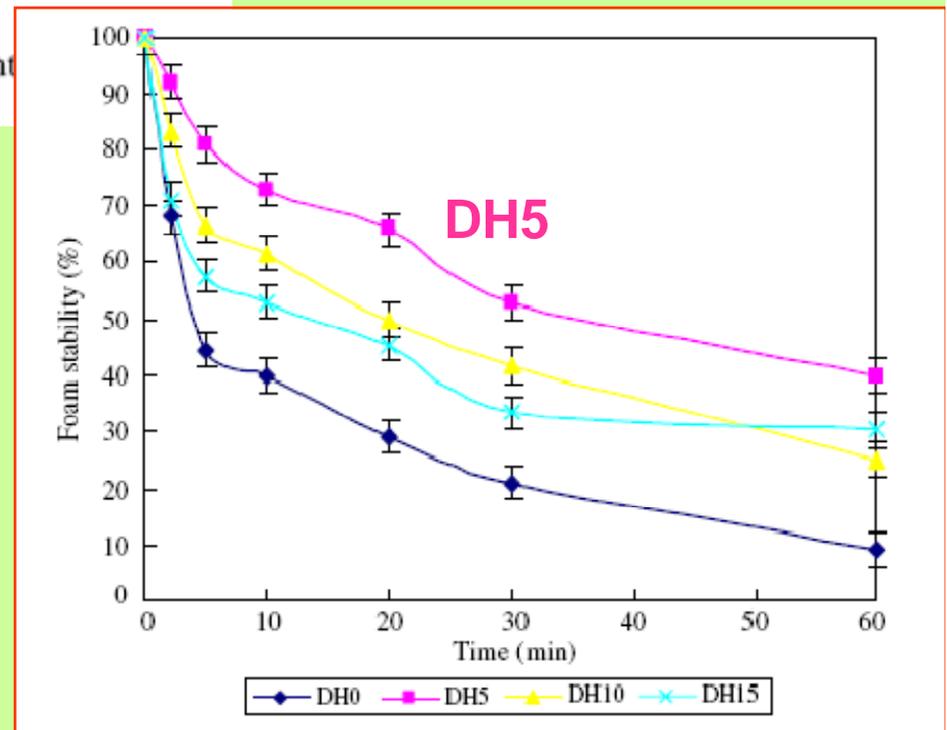


Fig. 6. Foaming capacity of AWGHs with different



Functional Properties of Protease Modified Wheat Flours

N. Bombara, M.C. Añón and A.M.R. Pilosof

Int' J. Food Sci. Technol. 30 (1997) No. 5

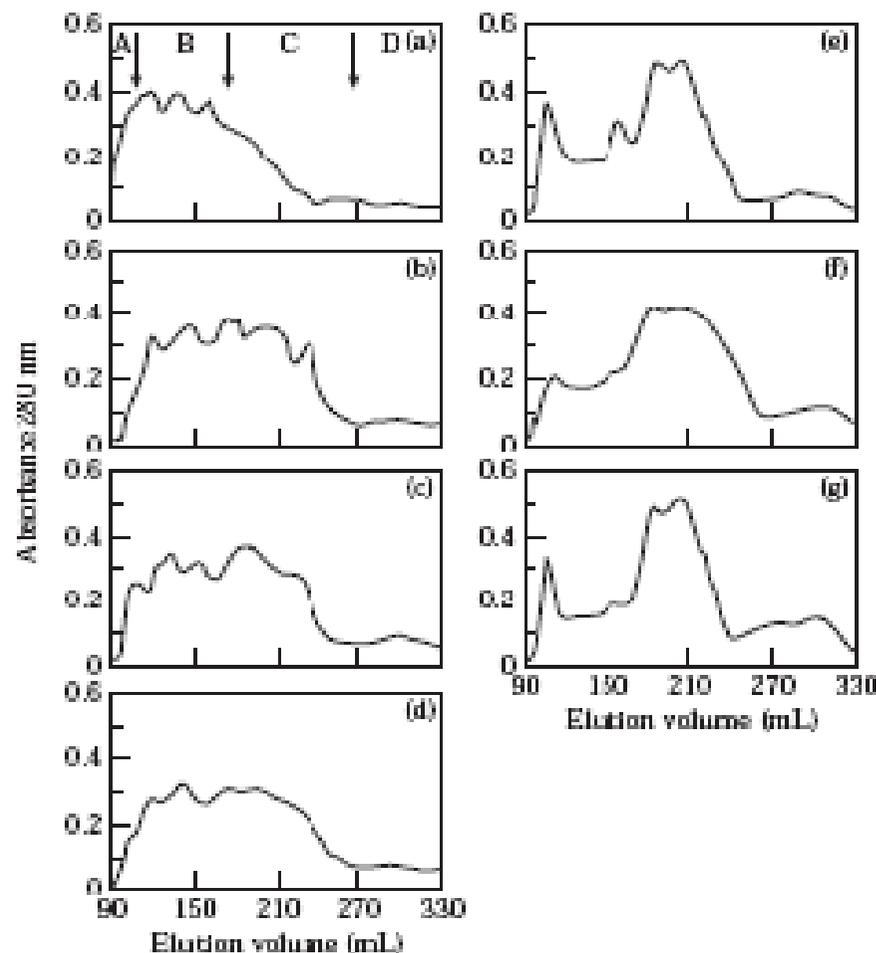


Fig. 1 Gel filtration chromatography on Sephacryl S-300 of proteins from (a) unmodified wheat flour, (b) blank, and (c-g) enzyme-modified wheat flours of different degrees of hydrolysis: (c) 3.8%, (d) 5.4%, (e) 14.1%, (f) 25.7% and (g) 36.7%. See text for explanation of regions A, B, C and D

Preparation of enzymatically modified wheat flour. Hydrolysis of wheat flour (220 g) was carried out in 550 mL distilled water in a batch laboratory reactor at 54 °C by stirring continuously. Protein concentration was 26.6 mg/g of slurry. On the basis of our previous work (7), enzyme (E) to substrate (S) ratios between 0.25/100 and 3/100 were selected to reach different degrees of hydrolysis. The appropriate amount of enzyme (20 mL) in 0.067 mol/L phosphate buffer, pH 7.0, were added to the slurry at 54 °C and hydrolysis was carried out for 1 h. A blank solution was run by

Table 2 Farinograph parameters of enzyme-modified wheat flours

Sample	FWA ^a (mL)	Mixing time ^b (min)
Wheat flour	6.02	1.5
Enzyme-modified wheat flours (% DH)		
0	7.78	2.1
3.8	7.89	2.6
5.4	7.59	3.3
14.1	6.47	0.7
25.7	5.78	1.1
36.7	5.67	0.7

^aFarinograph water absorption: mL of water added to 10 g flour to reach 500 BU at peak consistency.

^bMixing time: time to reach peak consistency.

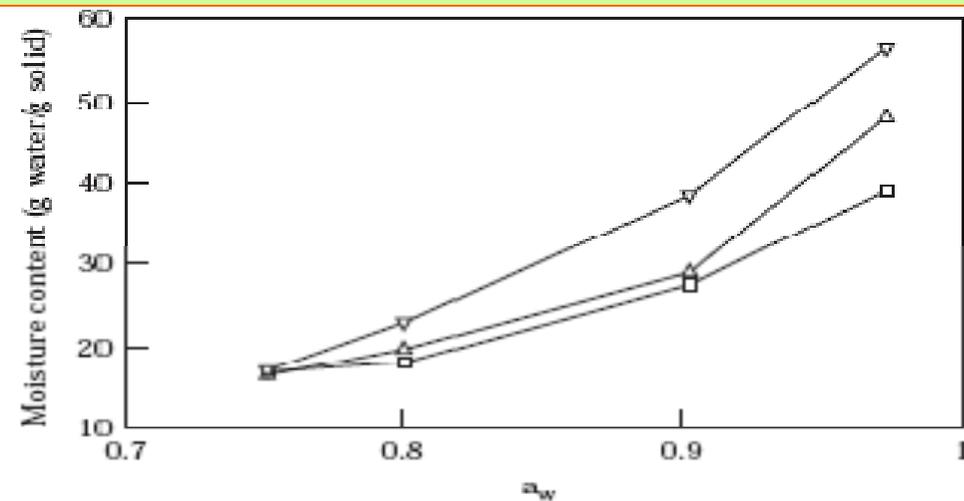


Fig. 6 Moisture adsorption isotherms of unmodified wheat flour (□), and enzyme-modified wheat flours of 14.1 % DH (△) and 36.7 % DH (▽)

Baking

Table 3 Influence of enzymatically modified wheat flour on sponge cake quality

Sample	Increase of cake volume ^a (%)	Symmetry index	Moisture (g/kg)
Flour	–	0.6	146
DH 3.8%	10	0.6	189
DH 14.1%	10	0.9	206
Flour/DH 14.1% 50:50	17	0.8	158

^aRelative to original flour.

The cake volume increased, the crumb became more yellow and looked more moist for the hydrolysed flours.

Table 3 shows that cake volume increased for 3.8–14.1% DH flours. A higher cake volume was obtained when using a mixture (50:50) of untreated and hydrolysed (14.1% DH) wheat flour. This behaviour may be explained on the basis of a previous work (6) where it was shown that while foaming power was enhanced by protein hydrolysis, foam collapse was increased by this treatment. This indicates that partially hydrolysed protein is needed to increase foam expansion but some larger protein components are needed to stabilize the foam. In the cakes obtained from a 50:50 mixture of untreated and hydrolysed wheat flour, the untreated fraction would contribute the high degree of gluten structure required for maximum stability during baking.

Aplicaciones de hidrolizados proteicos de alto grado de hidrólisis o extensivos, por encima del 10%

El desarrollo y diseño de hidrolizados extensivos está siendo objeto de un enorme impulso en los últimos años.
Estos hidrolizados podrían dividirse a su vez en dos grandes grupos

aquellos para ser usados como suplemento proteico en la dieta

Requerimiento de un sobreaporte proteico



alimentación de la tercera edad.

alimentación enteral y parenteral en casos de hospitalización

hidrolizados con una composición definida para el tratamiento de enfermedades o síndromes específicos

En **nutrición deportiva**, sobre todo en ejercicios de resistencia que requieren un desarrollo muscular importante o incluso culturismo.

En este sentido, bebidas refrescantes suplementadas con péptidos pueden tomarse durante el ejercicio o tras su finalización.



Bebida desarrollada por NIZO, para los atletas olímpicos holandeses, Atenas 2004.

la aplicación de exopeptidasas como Flavourzyme permite reducir el amargor de los hidrolizados con alto grado de hidrólisis.

---pro-- Amargo
----pro No amargo

Aplicaciones medicinales de los hidrolizados proteicos

Sin duda la más conocida e importante por su impacto en nutrición ha sido la producción de **hidrolizados hipoalergénicos**.

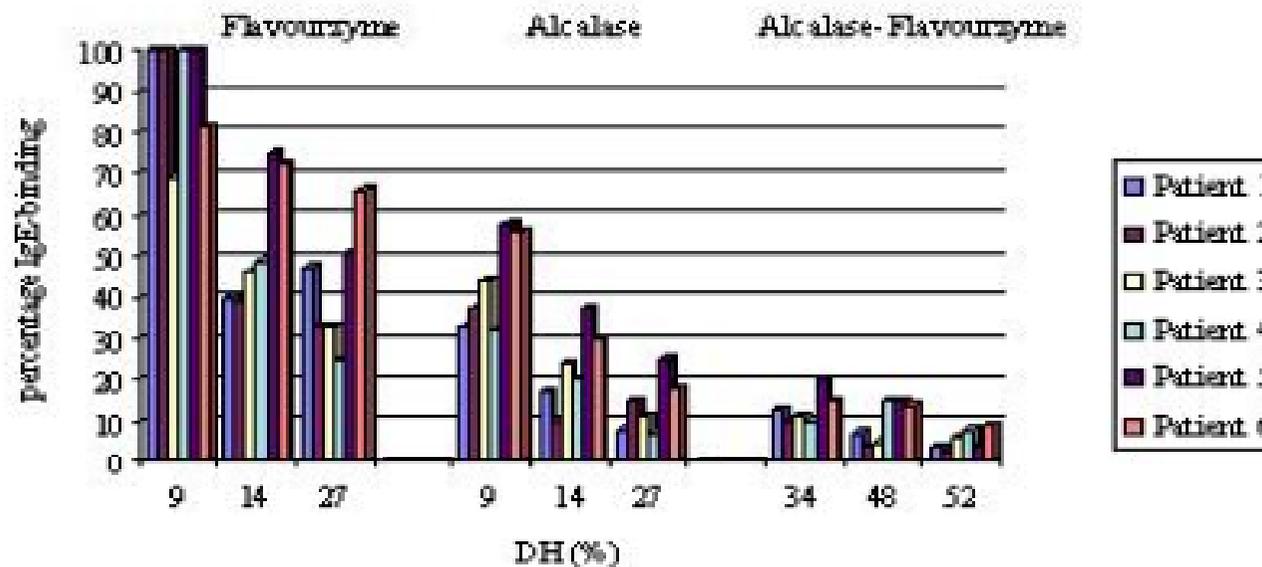


Fig. 2: Antigenic activity of chickpea protein hydrolysates with respect to the protein isolate. Protein hydrolysates were obtained by individual treatment with Flavourzyme, Alcalase or sequential treatment Alcalase-Flavourzyme. IgE-binding of CPI was considered 100%

La hidrólisis secuencial con Alcalase y Flavourzyme es una estrategia adecuada.

Aplicaciones medicinales

en el caso de errores metabólicos congénitos como la fenilcetonuria o tirosinemia se proponen hidrolizados sin los aminoácidos aromáticos que estos enfermos no pueden metabolizar

En estados hipermetabólicos como los procesos de cicatrización por cirugía o quemaduras se hace necesario un sobreaporte de aminoácidos azufrados que podrían ser proporcionados en forma de hidrolizados enriquecidos en estos aminoácidos

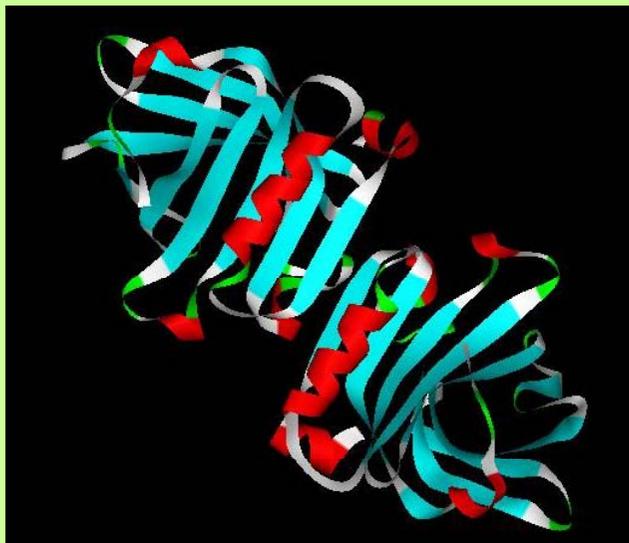
En enfermedades hepáticas, donde son necesarios alimentos con una alta razón de Fischer (ramificados/aromáticos), hidrolizados proteicos enriquecidos en Val Leu e Ile y pobres en aromáticos también son apropiados

En enfermos con una actividad gastrointestinal deficiente, como en los casos con reducida superficie de absorción (enfermedad de Crohn) o cuando la capacidad digestiva está reducida como en la fibrosis quística o la pancreatitis

PÉPTIDOS BIOACTIVOS

PÉPTIDOS BIOACTIVOS

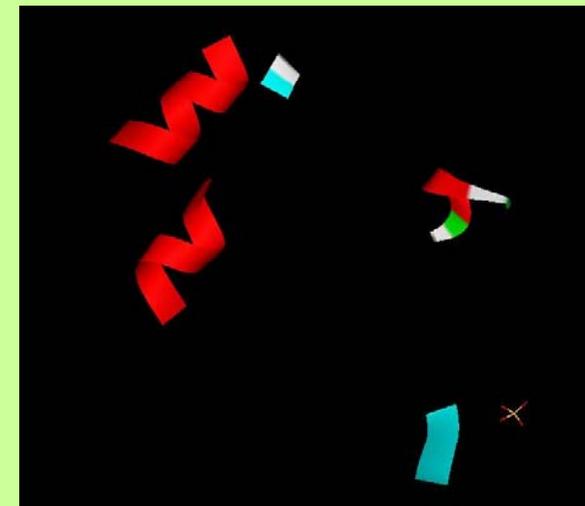
Determinadas secuencias de aminoácidos, inactivos en la secuencia de la proteína precursora, pero que presentan determinadas actividades biológicas una vez liberados mediante hidrólisis química o enzimática



forma inactiva o
menos activa



hidrólisis



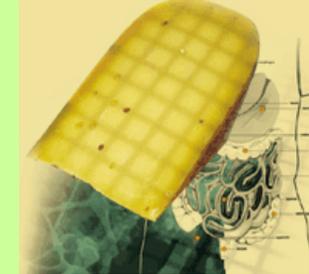
péptidos bioactivos

PÉPTIDOS BIOACTIVOS

FORMACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

***In vivo* (digestión gastrointestinal)**

- **Digestión gastrointestinal**
 - Efectos en cualquier parte del organismo, previa absorción
 - Efectos locales: tracto gastrointestinal



In vitro o mediante elaboración industrial

- **Procesado de los alimentos. P. ej. fermentación**
- **Producción de péptidos bioactivos**



PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Efectos en el aparato digestivo

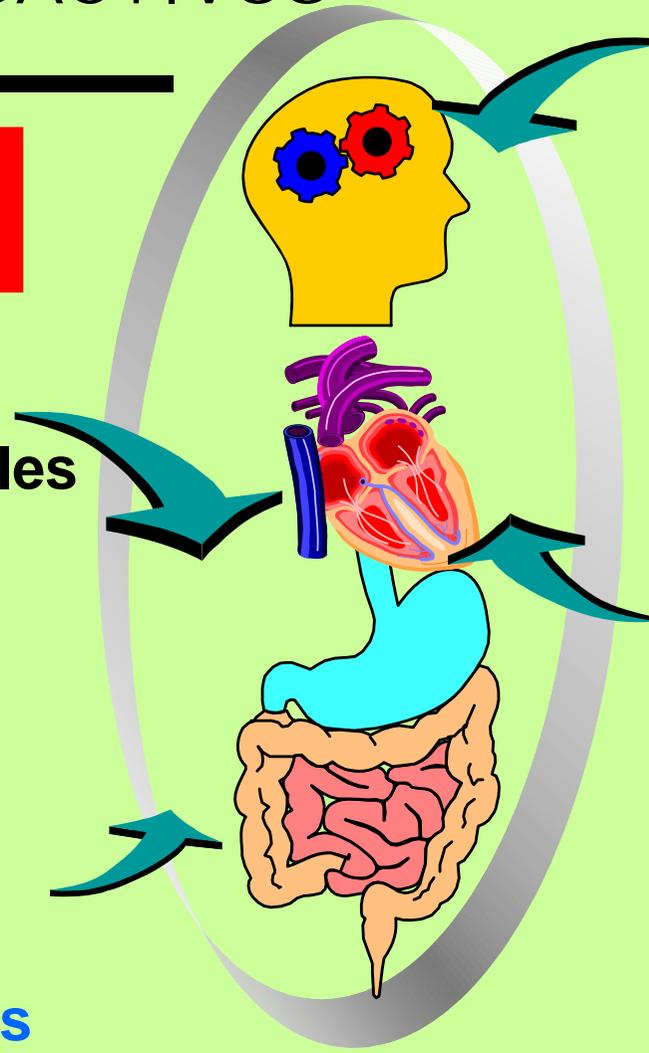
Efecto opiáceo

Unión de minerales

Efectos en las defensas del organismo

Antimicrobianos

Inmunomodulantes



Efectos en el sistema nervioso

Efecto opiáceo

Efectos en el sistema cardiovascular

Antihipertensivos

Antitrombóticos

PÉPTIDOS BIOACTIVOS

OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS

Proteínas lácteas, de huevo, vegetales
+
Distintas enzimas de grado alimentario



FERMENTACIÓN

Leches fermentadas

Queso

Bioactive peptides 1

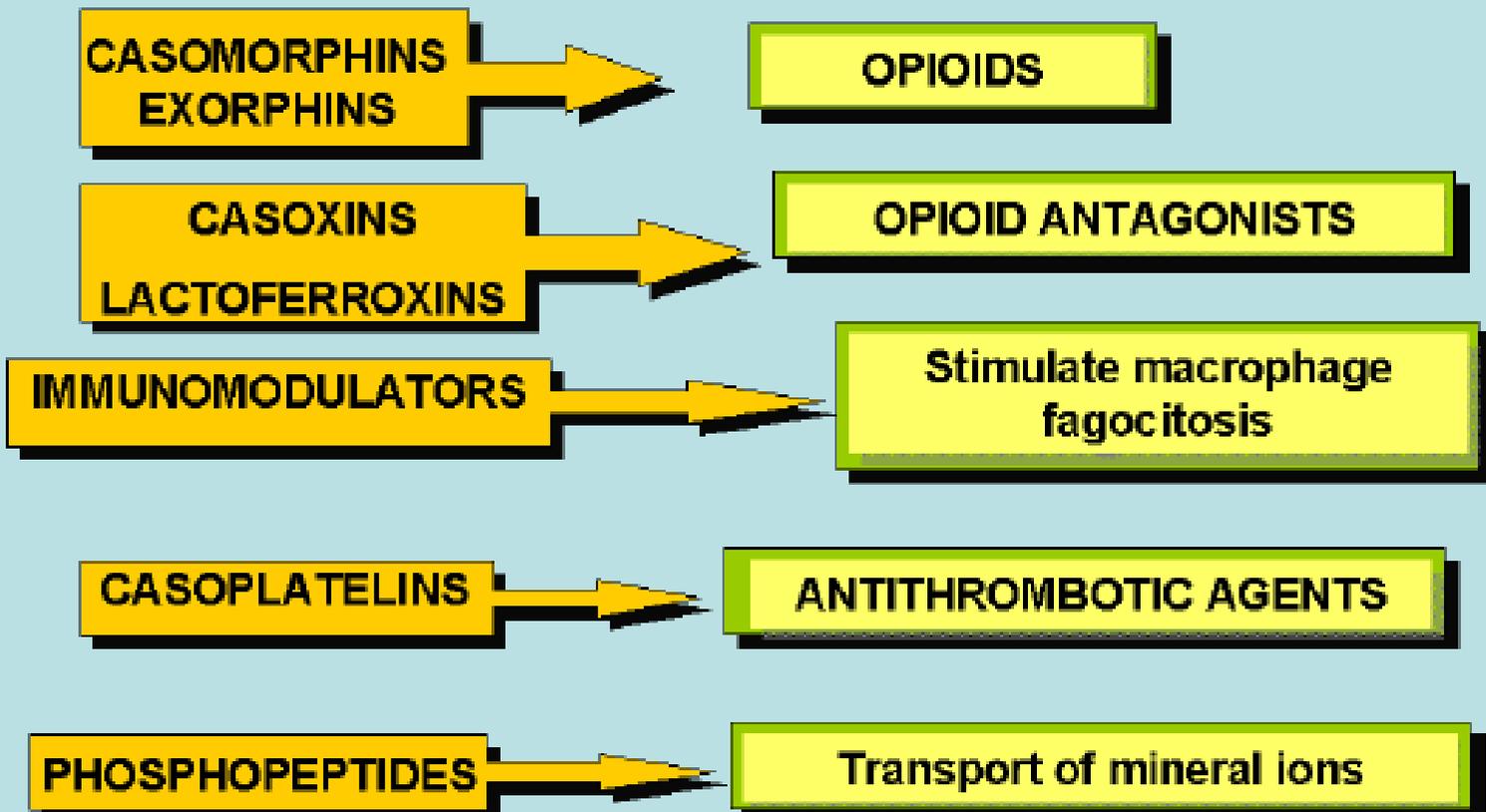


Figure 2

PÉPTIDOS BIOACTIVOS

HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS

β -Lg



péptidos **antihipertensivos**
péptidos **antioxidantes**

clara de huevo



péptidos antihipertensivos
péptidos antioxidantes

caseínatos



péptidos antihipertensivos

α_{s2} -caseína
 κ -caseína



péptidos **antimicrobianos**



FERMENTACIÓN

Quesos



péptidos antihipertensivos

Productos lácteos fermentados comerciales



antihipertensivos

Leches fermentadas



péptidos antihipertensivos



PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS

Hipertensión



Patologías cardiovasculares
Insuficiencia renal

Gasto anual en fármacos en USA 15000 millones de dólares

Disminución de 5 mm Hg → reduce 16% riesgo accidente cardiovascular

Angiotensina-I

DRVYIHPFHL

Angiotensina-II

DRVYIHPF

potente
vasoconstrictor



ECA



Inhibidores ECA

Bradiquinina

Vasodilatador

Inactivación
Bradiquinina





Contiene los siguientes tripéptidos que actúan como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.

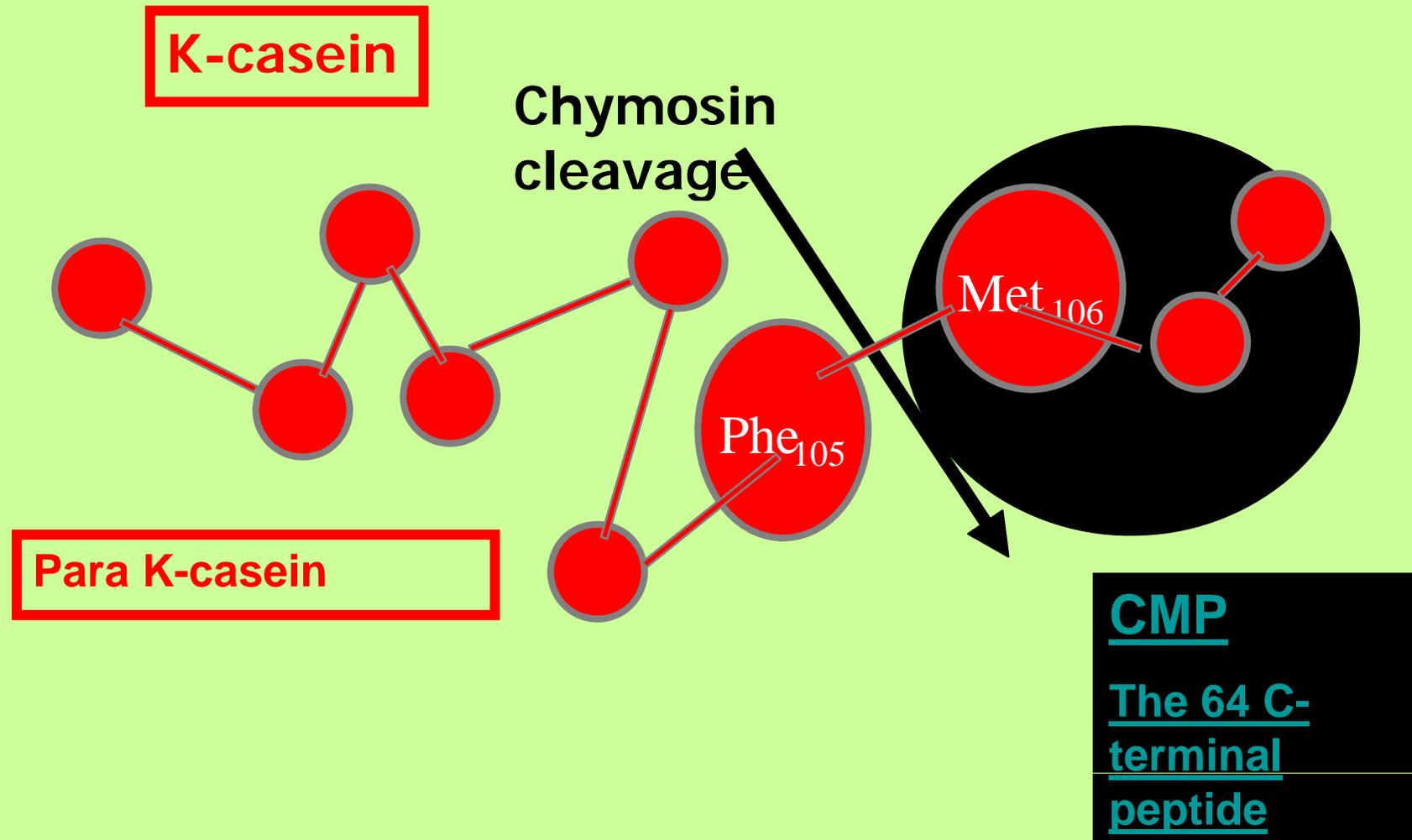
isoleucina-prolina-prolina

Valina--prolina-prolina

Estructura del caseinomacropéptido

- El caseinomacropéptido, glicomacropéptido o GMP consiste en una cadena peptídica de 64 aminoácidos. Se obtiene a partir de la ruptura enzimática de la k-caseína por la quimosina o la pepsina durante la elaboración del queso. La porción C-terminal, el GMP, es altamente soluble y se encuentra junto a las proteínas del suero de leche.
- EL GMP constituye entre 20-25 % de las proteínas del suero de leche.

CASEINOMACROPEPTIDE (CMP)



Physical properties of dairy proteins

Protein	Molecular mass (kg/mol)	Concentration (g/L)	pI
β -Lactoglobulin	18	3.2	5.4
α -Lactalbumin	14	1.2	4.4
Serum albumin	66	0.4	5.1
Immunoglobulin G	150	0.7	5–8
Lactoferrin	77	0.1	7.9
Lactoperoxidase	78	0.03	9.6
κ -Casein	19	3.3	5.8
β -Casein	24	9.3	5.2
α_s -Caseins	24	13	4.9/5.3
Glycomacropeptide	8.6	1.5	<3.8

Etzel,2004

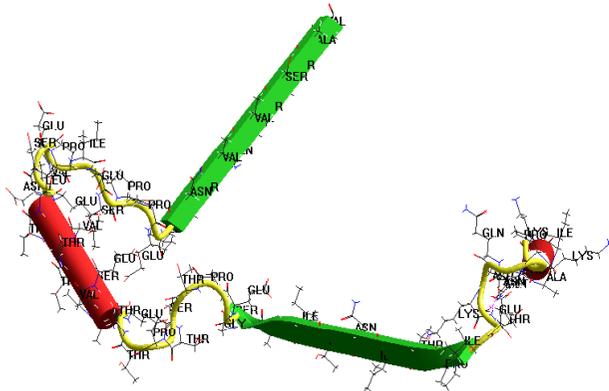
- Las formas glicosiladas representan aproximadamente el 50 % del total del GMP
- Se han identificado 14 formas glicosiladas en adición con las formas aglico- y múltiplefosforiladas (Molle´ & Leónil, 1995).

Ácido siálico

- Está asociado con el incremento de gangliósidos en el cerebro y mejorar la habilidad de aprender.
- El total de ácido siálico es más alto en el calostro y decrece el 80 % cerca de los tres meses.
- La leche de madres de prematuros contiene 13-23 % más de ácido siálico
- El ácido siálico contenido en fórmulas para lactantes es < 25 % que en la leche humana



Wang et al., 2001



Esta figura está adaptada a los estudios de Loucheux-Lefebvre et al., 1978 y Creamer et al., 1998

Péptido bioactivo

Es un fragmento específico de una proteína que tiene impacto sobre las funciones y condiciones corporales

s. cardiovascular

s. digestivo

s. inmunológico

s. nervioso

SALUD



reduce el riesgo de enfermedades crónicas y brinda protección al organismo de posibles infecciones (Korhonen y Pihlanto, 2006)

BENEFICIOS

- ➔ • Inhibición de infecciones bacterianas y virales (Brody, 2000).
- Neutralización de endotoxinas (Brody, 2000)
- Supresión de secreciones gástricas (Brody, 2000)
- Promoción del crecimiento de probióticos (Brody, 2000)
- Inhibición de las toxinas del cólera y *Escherichia coli* (Brody, 2000)
- Modulación de la composición de la placa dental bacteriana. (Thoma-Worringer et al., 2006)
- La reducción de la disolución de hidroxiapatita (componente estructural de los dientes) y la promoción de la remineralización (Brody, 2000).
- Segrega CCK (colecistoquina) hormona relacionada con la saciedad (Guilloteau et al., 1994; Beucheur et al., 1994; Burton-Freeman., 2007)
- Juega un rol en la modulación de la presión arterial tanto intacto como hidrolizado (Miguel et al., 2007)
- Inhibidor de la agregación de plaquetas y trombosis (Manso et al. 2002)
- Modulación del sistema inmunológico (Brody, 2000)
- Absorción de Calcio, Hierro y Zinc (Silva y Malcata; 2005)