

Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A. C.

“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE
PÉPTIDOS ANTIOXIDANTES DE PROTEÍNA
DE SOYA HIDROLIZADA”

Que presenta:

Edgar Iván Jiménez Ruíz

Como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias

Tesis aprobada por:

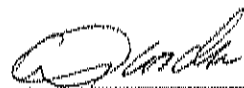
Coordinación de Tecnología de Alimentos
de Origen Animal

Diciembre de 2004, Hermosillo, Sonora.

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten citas breves del material contenido en este trabajo sin el permiso del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar créditos a CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



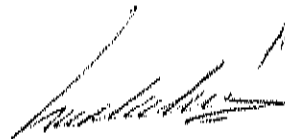
Dr. Alfonso Gardea Béjar
Director General

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Edgar Iván Jiménez Ruiz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



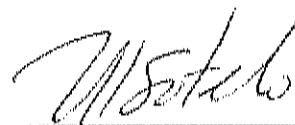
Dra. E. Aida Peña Ramos
Directora de tesis



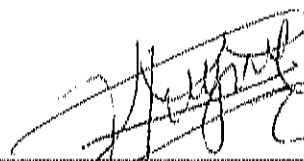
Dra. Ana María Calderón de la Barca



Dr. Ramón Pacheco Aguilar



Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo



M.C. Humberto González Ríos

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: Por permitirme llegar y lograr una meta más en mi vida.

A MI FAMILIA, por ser mi base y mi motor para seguir adelante...

A CONACYT: Por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo.

A CIAD: Por darme la oportunidad de formarme no solo como persona, sino profesionalmente, y ser como mi segunda casa...

AL GRUPO DE TRABAJO DE CARNES Y A LA DTAOA: A todos con los que conviví y me apoyaron durante mi estancia, GRACIAS...

AL COMITÉ DE TESIS: Dra. Ana Ma. Calderón de la Barca, Dr. Ramón Pacheco, Dr. Rogerio Sotelo, M.C. Humberto González, gracias por su apoyo, en especial a mi asesora la **Dra. Aida Peña**, muchas gracias por soportarme y por guiarme de la mejor manera en todos los aspectos...

GRACIAS POR EL APOYO TÉCNICO Y CONSEJOS A: Todos los que trabajan en los laboratorios donde realicé parte de mis experimentos, en especial a: "Wero Vázquez", René, Karina García, Víctor Ocaño, Martín Valenzuela, Martín Jara y a quienes me apoyaron incondicionalmente: Héctor, Ana Isabel (Docencia), "Don Héctor" (Centro de Copiado), Gerardo, Luis Conde (Biblioteca)...

A MIS MEJORES AMIGOS: Ana Laura ("Tetaroba"), Selene ("Chata"), Cecilia ("Gorda"), Indeliza ("Barotena"), Nayit ("Chanok"), Alonso ("Caballo"), Sergio ("Cheko"), Lilibian ("Carnala"), Dulce, Thelma ("Wera"), Fátima, Denise, Fernando ("Winnie"), Guillermo ("Memosh"), Joaquín ("Proculo"), Ricardo ("Mitata"), Tirso ("Maniaco"), Enrique ("La máscara"), Gaby ("Chilanga") y a todos con los que conviví durante mi paso por el Tecnológico de Los Mochis y en mi estancia en CIAD, gracias por todos esos momentos, en especial los de "con-bebios"...

DEDICATORIA

A DIOS Y SU HIJO ("Chuyito")...

A MIS PADRES, Félix ("Félios") y Flora ("Florita");

Por su apoyo y comprensión durante toda esta etapa.

A MIS ABUELOS, Don Félix ("Pelo Chino") y Margarita ("Doña Margarita"), María⁺ y Rosario⁺ ("Abuelo Chayo");

Por creer y sembrar tantas cosas buenas en mí persona.

A TODA MI FAMILIA:

A mi **hermana** Belén ("Prieta") y mis **tíos**: Octavio ("Rockstewart"), Margarita ("Jackson"), Elvia ("Maye"), Jesús ("Gyby"), Marisela ("La Mary"), Bertha ("Cory"), **primos**: Edgar ("Ñengas"), Gilberto ("Tón"), Aldo ("Wero"), "Chichan", "Pelotero", "Chón", Edith ("Gorda"), **sobrinos**: Carlos ("Pekio"), Pablo César ("Calle") y **personas que considero parte de mi familia**: "Maestra Chayito", "Doña Meche", "Lucy", Genaro ("Don José"), Juanita ("Doña Rosita"), Reynaldo ("tío Reynaldinho"). Gracias a todos y cada uno de ellos por su apoyo, compañía y momentos que han llenado mi vida de buenos recuerdos...y claro en especial a mi **novia** Nadia ("Mi pitufa"), gracias por estar conmigo y soportarme en los momentos más duros de este trabajo...

A TODAS ESAS PERSONAS, que de alguna manera fueron y son parte importante de mi vida y que me ayudaron a salir adelante no solo en lo que respecta en este trabajo, sino también en mi crecimiento personal...

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| LISTA DE TABLAS..... | x |
| LISTA DE FIGURAS..... | xi |
| RESUMEN..... | xii |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| HIPÓTESIS..... | 2 |
| OBJETIVOS..... | 2 |
| ANTECEDENTES..... | 3 |
| Lípidos en los alimentos..... | 3 |
| Oxidación de lípidos..... | 3 |
| Mecanismo..... | 4 |
| Factores que afectan la velocidad de oxidación..... | 4 |
| Composición de los ácidos grasos..... | 6 |
| Concentración de oxígeno..... | 6 |
| Temperatura..... | 7 |
| Actividad de agua..... | 7 |
| Metales de transición..... | 7 |
| Antioxidantes..... | 8 |
| Modo de acción..... | 9 |
| Antioxidantes sintéticos..... | 13 |
| BHA..... | 13 |
| BHT..... | 13 |
| PG..... | 14 |
| TBHQ..... | 14 |
| Antioxidantes naturales..... | 14 |
| Proteínas y compuestos de origen proteico con actividad antioxidante..... | 16 |

| | |
|--|----|
| Aminoácidos..... | 16 |
| Carnosina..... | 17 |
| Proteína de suero de leche..... | 19 |
| Proteína de soya..... | 20 |
| Otras proteínas de origen animal..... | 21 |
| Factores que influyen en la eficiencia de compuestos | |
| antioxidantes..... | 23 |
| Concentración..... | 23 |
| Fase de la oxidación..... | 23 |
| Estado físico del sistema lipídico..... | 23 |
| Hidrólisis de proteínas..... | 24 |
| Proteasas..... | 25 |
| Endo-peptidasas..... | 25 |
| Exo-peptidasas..... | 26 |
| Grado de hidrólisis..... | 26 |
| Ultrafiltración en el fraccionamiento de proteínas..... | 27 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 29 |
| Hidrólisis enzimática..... | 29 |
| Ultrafiltración..... | 29 |
| Caracterización parcial de los péptidos..... | 30 |
| Electroforesis en gel de poli-acrilamida (SDS-PAGE)..... | 30 |
| Composición de aminoácidos..... | 31 |
| Hidrofobicidad de superficie..... | 31 |
| Solubilidad..... | 32 |
| Actividad antioxidante..... | 33 |
| Sistema modelo de liposomas..... | 33 |
| Reducción de radicales libres..... | 34 |
| DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 35 |

| | |
|--|----|
| RESULTADOS..... | 36 |
| Hidrólisis enzimática..... | 36 |
| Ultrafiltración..... | 36 |
| Caracterización parcial de los péptidos..... | 38 |
| SDS-PAGE..... | 38 |
| Composición de aminoácidos..... | 42 |
| Hidrofobicidad de superficie..... | 44 |
| Solubilidad..... | 46 |
| Actividad antioxidante..... | 49 |
| Sistema modelo de liposomas..... | 49 |
| Reducción de radicales libres..... | 55 |
| Análisis multivariado..... | 57 |
| Análisis de correlación..... | 57 |
| Regresión lineal múltiple..... | 61 |
| Validación cruzada..... | 63 |
| CONCLUSIONES..... | 67 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 69 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|---|--------|
| 1. Concentración de proteína total del APS y las distintas fracciones proteicas obtenidas por ultrafiltración | 37 |
| 2. Concentración de aminoácidos del APS y las distintas fracciones proteicas..... | 43 |
| 3. Solubilidad (pH 7) del APS y las distintas fracciones proteicas obtenidas | 48 |
| 4. Actividad antioxidante de la proteína intacta, los hidrolizados y las distintas fracciones proteicas obtenidas por ultrafiltración | 50 |
| 5. Concentración de isoflavonas de los hidrolizados y las muestras F4 y Q4..... | 53 |
| 6. Capacidad para atrapar radicales libres del APS y las distintas fracciones proteicas obtenidas | 56 |
| 7. Coeficiente de correlación entre la solubilidad, hidrofobicidad y aminoácidos y la actividad antioxidante medida en dos sistemas | 58 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|---|--------|
| 1. Esquema general de las diferentes etapas que intervienen en la oxidación lipídica..... | 5 |
| 2. Esquema de la estabilización por resonancia de un antioxidante fenólico..... | 11 |
| 3. Esquemización de la actividad quelante de un secuestrador de metales (EDTA)..... | 12 |
| 4. Complejo propuesto para la actividad quelante de la carnosina, en este caso con el cobre..... | 18 |
| 5. Electroforesis en geles de poli-acrilamida (SDS-PAGE) de las distintas muestras proteicas..... | 39 |
| 6. Hidrofobicidad de superficie del APS, los hidrolizados y las distintas fracciones proteicas obtenidas por ultrafiltración..... | 45 |
| 7. Gráfica de dispersión de los valores de actividad antioxidante real y la actividad antioxidante obtenida con la validación cruzada | 64 |
| 8. Gráfica de dispersión de los valores de actividad anti-radical real y la actividad anti-radical obtenida con la validación cruzada..... | 65 |

RESUMEN

Se ha demostrado la actividad antioxidante de proteínas como la de soya y su incremento con la hidrólisis enzimática. Sin embargo, los hidrolizados proteicos de soya no han mostrado ser mejores que otros antioxidantes para inhibir la oxidación lipídica, debido tal vez a la presencia de fracciones pro-oxidantes. El objetivo de este estudio fue fraccionar los componentes de un hidrolizado de soya por tamaño, caracterizarlos y evaluar su capacidad antioxidante. Se hidrolizó un aislado proteico de soya (APS), con una enzima cruda (Flavourzyme[®]) y una enzima pura (quimiotripsina). Los hidrolizados se ultrafiltraron con membranas de distintos cortes (50, 10 y 3 kDa). La actividad antioxidante de las fracciones peptídicas obtenidas se evaluó en un sistema modelo de oxidación de liposomas catalizado por iones fierro y en uno de radicales libres. Se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se les evaluó su solubilidad, hidrofobicidad de superficie y composición de aminoácidos. Mediante análisis multivariado se determinó la relación de sus características y la capacidad antioxidante en los dos sistemas. Las fracciones en general mostraron ser más efectivas que la proteína de soya intacta y el hidrolizado total, en especial las obtenidas con la membrana de 3 kDa (F4 y Q4), con una inhibición de oxidación de 83.20 y 84.46%, respectivamente, en el sistema de liposomas. Estas mismas fracciones fueron las más efectivas en el sistema de radicales libres con un 21.26 y 24.35% de estabilización de radicales libres, para F4 y Q4, respectivamente. Los análisis multivariados mostraron la importancia de la hidrofobicidad, solubilidad y algunos aminoácidos como la fenilalanina, tirosina y cisteína, sobre las propiedades antioxidantes de las fracciones proteicas. Se concluyó que la ultrafiltración permitió la separación de fracciones proteicas con una capacidad antioxidante mayor que la del hidrolizado. Se sugiere en próximos estudios evaluar las fracciones más efectivas en alimentos susceptibles al deterioro oxidativo, como son los productos cárnicos.

INTRODUCCIÓN

La oxidación de lípidos es una de las mayores causas de deterioro de los alimentos, ya que provoca la pérdida de sus propiedades funcionales y valor nutricional. En el organismo se asocia con varios tipos de daños fisiológicos, como aterosclerosis, envejecimiento y carcinogénesis. Por ello, su estudio se considera importante, no sólo en la industria de alimentos sino también para la salud humana (Ladikos y Lougovois, 1990; Gray y cols., 1996).

Una alternativa para evitar o disminuir la velocidad de oxidación en la industria de alimentos, es el empleo de antioxidantes (Gray y cols., 1996; Sahoo y Verma, 1999; Yen y cols., 1999). Existen diversos compuestos naturales y sintéticos con propiedades antioxidantes. En la actualidad se han cuestionado algunos antioxidantes sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y la terbutilhidroxiquinona (TBHQ). Esto debido a estudios que relacionan dichos compuestos con posibles riesgos en la salud, principalmente efectos cancerígenos. Este hecho, aunado a la tendencia de consumir alimentos de origen natural, ha promovido la búsqueda de fuentes naturales de antioxidantes (Marshall, 1974).

Las proteínas se encuentran entre las fuentes de antioxidantes naturales que se han estudiado en los últimos años. Algunas proteínas como la de soya, han demostrado tener capacidad para inhibir la oxidación de lípidos en sistemas modelo y alimenticios (Bishov y Henick, 1972; Yee y cols., 1980; Rajalakshmi y Narasimhan, 1996; Hirose y Miyashita, 1999; McCarthy y cols., 2001a; O'Sullivan y cols., 2004). Se ha comprobado que la hidrólisis aumenta las propiedades antioxidantes de esta proteína (Chiang y cols., 1999; Peña-Ramos y Xiong 2002). Sin embargo, pueden existir fracciones pro-oxidantes en las mezclas de hidrolizados, que afectan su poder antioxidante; es posible que al separar estas fracciones peptídicas las propiedades antioxidantes se incrementen (Yee y cols., 1980; Peña-Ramos y Xiong 2002).

HIPÓTESIS

La proteína de soya hidrolizada contiene péptidos pro- y antioxidantes y al fraccionarla mediante ultrafiltración, al menos una de las fracciones tendrá mayor poder antioxidante que el hidrolizado total.

OBJETIVOS

General:

-Obtener fracciones peptídicas a partir de proteína de soya hidrolizada para evaluar su actividad antioxidante y caracterizarlas parcialmente.

Específicos:

-Obtener enzimáticamente hidrolizados proteicos de soya y fraccionarlos por ultrafiltración.

-Evaluar la capacidad antioxidante de las diversas fracciones a través de su habilidad para reducir la oxidación en un sistema modelo de liposomas y en un sistema basado en la estabilización de un radical libre.

-Determinar la composición de aminoácidos, solubilidad e hidrofobicidad de superficie de las fracciones obtenidas.

-Evaluar la influencia de las características de las fracciones sobre su capacidad antioxidante.

ANTECEDENTES

Lípidos en los Alimentos

Los lípidos están presentes en casi todas las materias primas alimenticias, siendo la mayor parte triglicéridos que se encuentran en las células de almacenamiento de grasa de plantas y animales. Existen también los fosfolípidos que forman parte de las membranas biológicas, y al igual que los triglicéridos contienen en su estructura ácidos grasos (ácidos monocarboxílicos alifáticos), que pueden ser saturados o insaturados (Nawar, 1996; Gordon, 2001).

Oxidación de Lípidos

La autooxidación de ácidos grasos insaturados es una de las reacciones fundamentales en el deterioro de lípidos. Se presenta durante el almacenamiento de alimentos crudos, procesamiento, tratamiento térmico y almacenamiento prolongado de productos terminados. Los radicales libres formados durante la oxidación causan deterioro en los alimentos, que puede afectar el color, aroma o textura. Las características, cantidad y velocidad de formación de los compuestos producidos durante la degradación de lípidos están influenciadas por una serie de factores. Algunos de estos dependen de la composición del alimento y otros del método o condiciones de almacenamiento (Nawar, 1996; Karpinska, y cols., 2001).

Mecanismo

En la Fig. 1 se muestra el mecanismo más representativo del deterioro oxidativo. Este se inicia cuando los lípidos pierden un átomo de hidrógeno en presencia de catalizadores como los metales de transición, calor, luz y energía de radiación. Así se origina la formación de radicales libres (R^\bullet), estos son muy inestables y reaccionan fácilmente con el oxígeno para formar ROO^\bullet .

Los ROO^\bullet pueden interactuar con otro RH intacto, para iniciar una reacción en cadena (propagación) y producir un nuevo R^\bullet , además de $ROOH$. Al igual que los R^\bullet , los $ROOH$ son inestables y se descomponen en radicales alcoxil (RO^\bullet) y de otro tipo.

Los RO^\bullet y otras especies de radicales producidos durante la propagación pueden combinarse con moléculas diferentes y entre sí para formar compuestos estables (no radicales). Estos también pueden descomponerse en moléculas de menor peso molecular, que son responsables de la rancidez. A esta última etapa se le llama terminación y en ella pueden suceder múltiples interacciones al azar entre diferentes intermediarios de la ruta oxidativa.

Factores que Afectan la Velocidad de Oxidación

Los lípidos en alimentos comprenden una gran variedad de ácidos grasos, que difieren en sus propiedades físicas y químicas, así como en su susceptibilidad a oxidarse. Además, los alimentos contienen muchos compuestos no-lipídicos, que pueden oxidarse o interactuar con las grasas y los productos de su oxidación. Estas interacciones pueden aumentar o disminuir la velocidad de oxidación de los lípidos presentes en la matriz alimenticia.

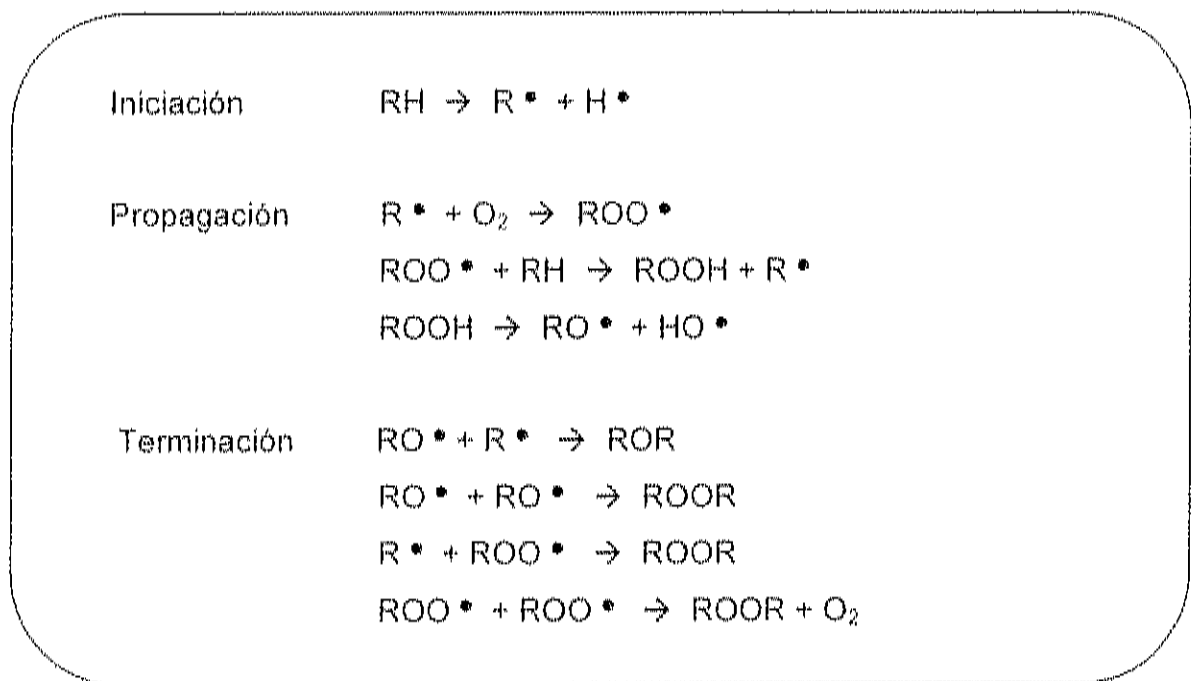


Fig. 1. Esquema general de las diferentes etapas que intervienen en la oxidación lipídica (Nawar, 1996; Hamilton, 1999; Gordon, 2001).

Entre los principales factores que afectan la velocidad de oxidación se encuentra la composición de los ácidos grasos, la temperatura, concentración de oxígeno, humedad, presencia de metales de transición, además de energía radiante (Gray, 1996; Nawar, 1996). Es importante analizar el efecto de estos factores para comprender el mecanismo de deterioro oxidativo que siguen los lípidos presentes en los alimentos susceptibles a la oxidación.

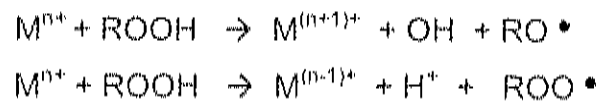
Composición de los ácidos grasos. El número, posición y geometría de los dobles enlaces afectan la velocidad de oxidación de los ácidos grasos presentes en los lípidos. Los ácidos grasos insaturados (presentan dobles enlaces) son más susceptibles al deterioro oxidativo y esta susceptibilidad aumenta con la cantidad de insaturaciones. Por ejemplo, las velocidades de oxidación relativa del ácido araquidónico, linolénico, linoleico y oleico son: 40:20:10:1, respectivamente. La oxidación de los ácidos grasos saturados es extremadamente lenta, ya que a temperatura ambiente permanecen prácticamente intactos, mientras que en los insaturados ya es detectable. Sin embargo, a altas temperaturas la velocidad de oxidación de los ácidos grasos saturados llega a ser significativa. Los dobles enlaces conjugados son más reactivos que los no conjugados y los ácidos grasos que presentan sus dobles enlaces con geometría en posición "cis" tienden a oxidarse más rápidamente que sus isómeros "trans" (Nawar, 1996; Gordon, 2001).

Concentración de oxígeno. Cuando el oxígeno presente en el sistema alimenticio es abundante, la velocidad de oxidación es independiente de su concentración. Sin embargo, la velocidad de oxidación llega a ser proporcional a la concentración de oxígeno cuando esta es muy baja. Además, el efecto de este elemento sobre el proceso oxidativo también depende de factores como la temperatura. Cuando las temperaturas son altas se presentan cambios en la presión parcial del oxígeno, que lo hacen menos soluble en los lípidos y el agua, disminuyendo su efecto sobre el proceso oxidativo (Nawar, 1996).

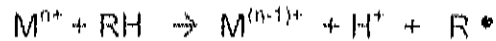
Temperatura. En general, la velocidad de oxidación de lípidos se incrementa a medida que aumenta la temperatura, de hecho las altas temperaturas tienen efecto catalizador sobre cada una de las etapas de este proceso. Por otro lado, cuando las temperaturas son bajas también pueden llegar a promover el deterioro oxidativo. Cuando un alimento se somete a temperaturas de congelación, se incrementa el oxígeno disuelto, promoviendo la oxidación (Nawar, 1996; Monahan, 2000; Yanishlieva, 2001).

Actividad de agua (a_w). Cuando en sistemas alimenticios se tienen valores de a_w de 0.3, la oxidación se lleva a cabo muy lentamente. Sin embargo, a valores de a_w 0.55-0.85, la velocidad de oxidación es relativamente alta; se cree que probablemente se deba al aumento en la movilización de los catalizadores de la oxidación y el oxígeno presente. Al igual que en el caso anterior, cuando la a_w es extremadamente baja (menos de 0.1), el proceso oxidativo se lleva a cabo muy rápidamente (Kahl y cols., 1988; Nawar, 1996).

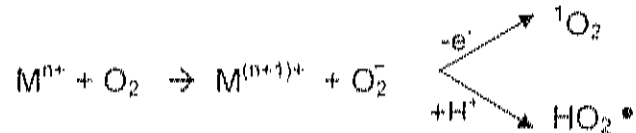
Metales de transición. Los metales de transición que actúan como pro-oxidantes, principalmente son aquellos que poseen dos o más estados de valencia y un potencial de oxidación-reducción adecuado (ej. cobalto, cobre, fierro, manganeso y níquel). Estos elementos son capaces de aumentar la velocidad de oxidación aún si se encuentran en concentraciones menores de 0.1 ppm. La acción pro-oxidante de los metales se lleva a cabo principalmente con la descomposición de hidroperóxidos:



Sin embargo, también se han propuesto otros dos mecanismos para la actividad pro-oxidante de los metales. El primero, supone que los metales reaccionan directamente con el sustrato (lípidos intactos, RH):



El segundo mecanismo propuesto es mediante la activación del oxígeno molecular produciendo radicales peróxido y especies reactivas de oxígeno:



Tanto el estado del metal, como la cantidad presente en la matriz alimenticia son importantes para que este ejerza su efecto pro-oxidante. Por ejemplo, el ión ferroso (Fe^{+2}) es más efectivo para promover la oxidación que el ión férrico (Fe^{+3}). Además, en presencia de ácido ascórbico, el hierro aumenta su eficiencia como catalizador, ya que este compuesto regenera el hierro a su estado ferroso.

El hierro hémico también puede ser factor importante para la inducción de la oxidación lipídica. A diferencia del hierro en estado libre, el hierro hémico parece ser más activo como catalizador del deterioro oxidativo cuando se encuentra en su estado férrico (Ladikos y Lougovois, 1990; Nawar, 1996; Yen y cols., 1999; Yanishlieva, 2001).

Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que en cantidades significativamente pequeñas -comparadas con el sustrato oxidable- pueden retardar o disminuir la velocidad de oxidación, evitando el deterioro de los alimentos que contienen lípidos (Lindsay, 1996). Estos compuestos no son la única alternativa para proteger los alimentos del deterioro oxidativo. Existen técnicas que actualmente

son aplicadas como el empaque en atmósferas modificadas o de vacío, usadas para excluir oxígeno (Coppen, 1999).

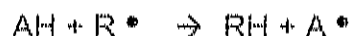
Los compuestos como el BHT, BHA y la TBHQ se han utilizado durante mucho tiempo para prevenir la oxidación lipídica en alimentos. Sin embargo, existen algunos estudios que relacionan estos compuestos con efectos cancerígenos (Ito y cols., 1986; Van-Esch, 1986; Takahasi, 1992). Por lo anterior, han sido objeto de estrictas regulaciones y rechazo por el consumidor, por no considerarse totalmente seguros para la salud.

Un antioxidante ideal debe de cumplir con ciertas características y requerimientos para ser incorporado a un sistema alimenticio. Estos deben de ser seguros para la salud humana y no impartir olor, color o sabor que puedan modificar negativamente las características del alimento al que es añadido. De acuerdo a su definición un antioxidante debe ser efectivo a bajas concentraciones y fácil de incorporar en la matriz alimenticia. Además, deben ser capaces de seguir cumpliendo su función después de procesos como el cocimiento, horneado o freído (Coppen, 1999).

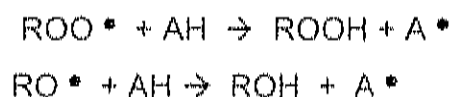
Modo de Acción

La mayoría de los antioxidantes, ya sean sintéticos o de origen natural, que actualmente se emplean en alimentos, tienen en su estructura grupos fenólicos o hidroxilo. Estos grupos son los responsables de la capacidad antioxidante, atrapando metales o mediante la donación de electrones para la estabilización de radicales libres (Lindsay, 1996; Decker y cols., 2000).

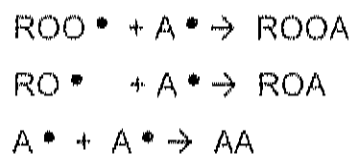
Los antioxidantes (AH) pueden intervenir en diferentes etapas del proceso de oxidación, dependiendo de su modo de acción. Son considerados antioxidantes primarios aquellos capaces de donar un átomo de hidrógeno a un radical libre, convirtiéndolo en un producto estable:



Además, este tipo de antioxidantes pueden reaccionar con radicales peróxidos o alcoxi para detener la reacción en cadena y la descomposición de hidroperóxidos:



Los radicales formados por el antioxidante ($A \bullet$) durante las etapas anteriores pueden reaccionar con otros radicales, para formar compuestos no-radicales:



Alternativamente, radicales provenientes del antioxidante se pueden estabilizar mediante resonancia (Fig. 2). Las estructuras resonantes del antioxidante tienen muy baja reactividad, por lo que no participan en la propagación de la reacción, ni en el ataque a un lípido intacto (Lindsay, 1996, Hamilton, 1999; Yanishlieva, 2001).

Por otro lado, existen compuestos antioxidantes capaces de reducir la velocidad de oxidación secuestrando iones metálicos, reduciendo el oxígeno presente o regenerando al antioxidante "agotado". Estos se denominan antioxidantes secundarios o sinérgicos tales como el EDTA, eritorbatos y el ácido cítrico.

Los compuestos secuestradores forman enlaces coordinados con los metales, disminuyendo así su capacidad para promover la oxidación lipídica (Fig. 3).

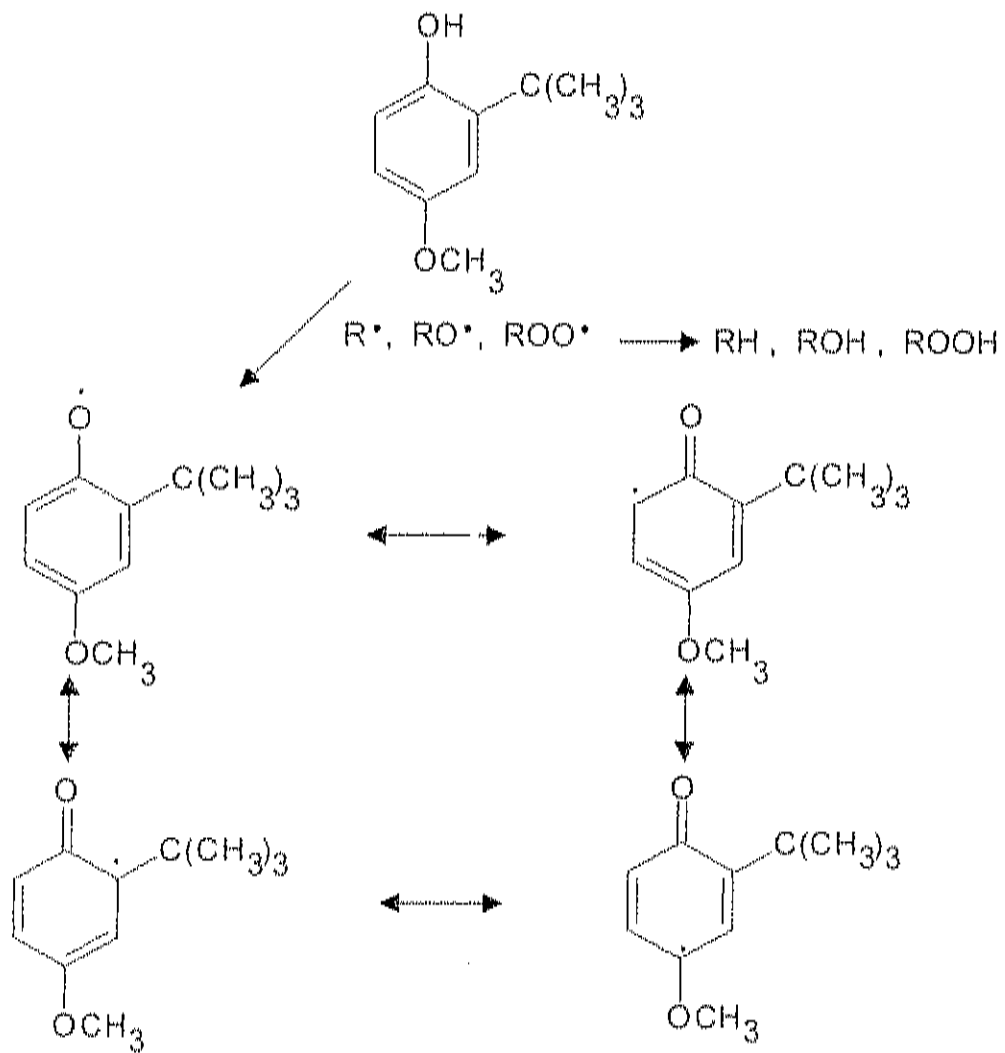


Fig. 2. Esquema de la estabilización por resonancia de un antioxidante fenólico.

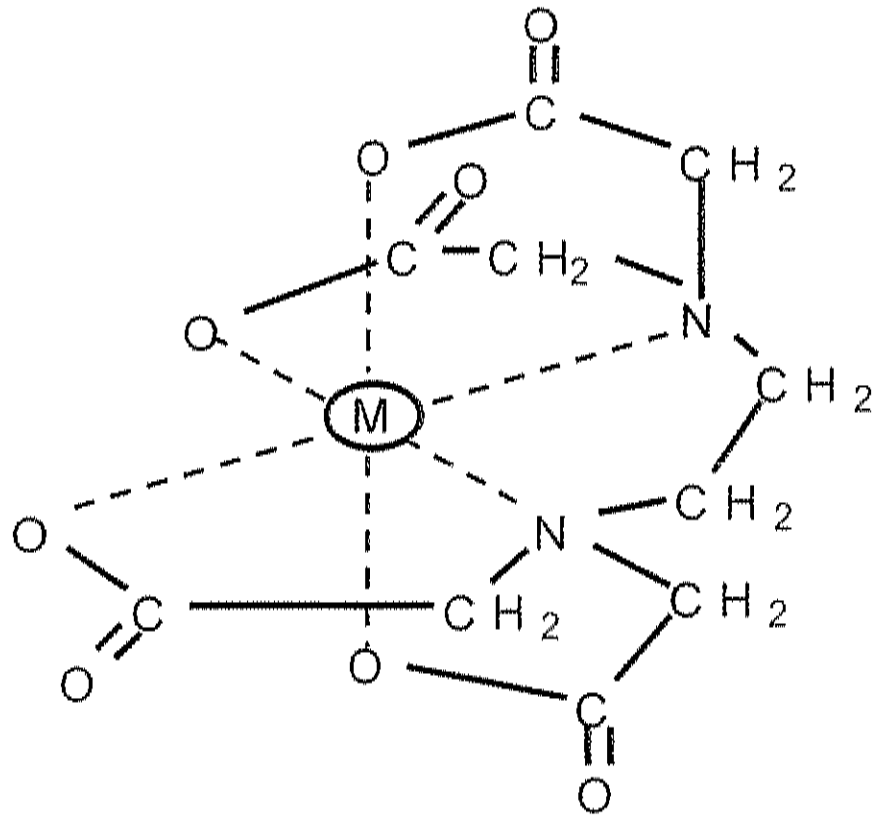


Fig. 3. Esquemmatización de la actividad quelante de un secuestrador de metales (EDTA). M: Ión metálico.

Lo anterior, se ha relacionado con la prevención del ciclo oxido-reducción de los metales y el bloqueo de sus sitios de coordinación. Además, se ha manejado que se da un impedimento estérico para que puedan reaccionar con los lípidos o intermediarios del proceso oxidativo.

Antioxidantes Sintéticos

Los antioxidantes más usados en la industria alimenticia son de origen sintético y su uso está regulado. En la mayoría de los casos, los antioxidantes sintéticos no deben exceder de 0.020% (200 ppm) basado en el contenido de grasa del alimento, al ser añadidos solos o combinados. Existen ciertas excepciones en el caso de alimentos y productos estandarizados que están cubiertos por regulaciones especiales (Nawar, 1996; Coppen, 1999; Miková, 2001).

BHA. Este compuesto presenta alta solubilidad en grasas animales y aceites vegetales y es un antioxidante efectivo para las primeras. Además tiene muy buena estabilidad bajo condiciones encontradas durante el procesamiento de alimentos, dando estabilidad a productos horneados o freídos. Su efecto como antioxidante es muy pobre en aceites vegetales, principalmente en aquellos que son ricos en antioxidantes naturales. Se ha visto que el BHA presenta un típico olor fenólico que puede notarse en los aceites que son sometidos a altas temperaturas (Nawar, 1996).

BHT. Es muy soluble en grasas y aceites, y al igual que el BHA es un antioxidante muy efectivo en grasas animales, pero menos eficaz en aceites vegetales. Aunque es capaz de resistir las altas temperaturas que se presentan durante el procesamiento de alimentos, no es tan efectivo como el BHA. El BHT presenta una acción aceptable de sinergismo al combinarse con otros antioxidantes primarios. Debido a que el BHT es más volátil que el BHA, se

recomienda que cuando se usen juntos, se agregue aproximadamente cinco veces más del primero en la mezcla (Yanishlieva, 2001).

PG. Este es usado en la estabilización de grasas animales y aceites vegetales así como en productos cárnicos, especias y bocadillos. Es ligeramente soluble en aceites pero presenta buena solubilidad en agua. Presenta la desventaja de que es muy inestable durante el horneado o freído, además, en presencia de agua forma un complejo con el hierro causando una coloración oscura (azul-negra). Por lo anterior se recomienda usarlo siempre en presencia de un secuestrador de metales como el ácido cítrico (Adegoke y cols., 1998; Coppen, 1999).

TBHQ. Este compuesto es mas efectivo que otros antioxidantes comunes, ya que provee gran estabilidad oxidativa a los aceites poli insaturados, ya sean crudos o refinados. Es considerado el mejor antioxidante en productos freídos, no así en productos horneados. Este antioxidante tiene algunas ventajas comparado con otros de su clase también usados en la industria alimenticia (ej. BHT, BHA, PG). La TBHQ no presenta problemas de color como el PG en presencia de hierro y agua, además que es mas estable a las altas temperaturas y menos volátil comparado con el BHA y el BHT (Sherwin y Thompson, 1967).

Antioxidantes Naturales

Aunque se ha evaluado y comprobado la actividad antioxidante de muchos compuestos de origen natural, muy pocos se utilizan actualmente en la industria. Algunos se han extraído de plantas y especias como el romero, salvia, orégano y te verde (Rajalakshmi y Narasimhan, 1996). Otros compuestos de origen natural con propiedades antioxidantes son el α , β , γ y δ -tocoferol. La

mayoría de los compuestos naturales capaces de inhibir la oxidación tienen estructuras fenólicas, con excepción del ácido ascórbico.

El ácido ascórbico tiene actividad de vitamina C y además posee propiedades reductoras gracias a su grupo 2,3-n-diol. Este ácido orgánico es muy versátil, ya que puede actuar como antioxidante primario, secundario o sinérgico. El ácido ascórbico cuando se encuentra en altas concentraciones (>1 mM) inhibe eficientemente la oxidación, sin embargo, a bajas concentraciones (0.01 mM), puede comportarse como pro-oxidante, especialmente en presencia de iones metálicos (Gregory III, 1996; Elliott, 1999; Yen y cols., 2002a).

Los tocoferoles son ampliamente conocidos por su actividad de vitamina E. Los más eficientes como vitamina E, son menos efectivos como antioxidantes. El orden de efectividad como antioxidante es $\delta > \gamma > \beta > \alpha$ -tocoferol. A diferencia del ácido ascórbico, estos pueden actuar como pro-oxidantes en altas concentraciones (Huang y cols., 1995).

Los principales compuestos con actividad antioxidante que han sido extraídos de algunas plantas y especias, han sido identificados como flavonoles, catequinas, pro-antocianidinas y antocianinas. Se ha descubierto que en la mayoría de los casos, estos compuestos actúan como antioxidantes primarios, además de poder quelar metales. Estas propiedades se atribuyen a los anillos fenólicos y grupos cetol presentes. Según investigaciones, algunos de estos pueden ser tan efectivos como el BHT, BHA o el α -tocoferol (Fukumoto y Mazza, 2000; McCarthy y cols., 2001a; McCarthy y cols., 2001b; Ranalli y cols., 2003; Murcia y cols., 2004).

Proteínas y Compuestos de Origen Proteico con Actividad Antioxidante

Se ha demostrado la capacidad de algunos aminoácidos como la prolina, tirosina e histidina para inactivar radicales libres (Marcuse, 1960; Karel y cols., 1975). Además se han estudiado las propiedades antioxidantes de algunos péptidos como la carnosina, anserina (Chan y cols., 1994; Baran, 2000) y proteínas como la de suero de leche y soya (Colbert y Decker, 1991; Chen y cols., 1995; Amarowicz y Shahidi, 1997; Tong y cols., 2000; O'Sullivan y cols., 2004). La capacidad de estos compuestos para reducir la oxidación lipídica se ha probado directamente en alimentos (Wu y Brewer, 1994; O'Neill y cols., 1998; McCarthy y cols., 2001a; McCarthy y cols., 2001b), aunque en la mayoría de los casos se utilizan sistemas modelo. En estos trabajos se ha atribuido la actividad antioxidante a la capacidad para atrapar radicales libres y secuestrar metales.

Aminoácidos. Los aminoácidos como la histidina, tirosina, fenilalanina, triptófano, cistina, prolina y lisina poseen propiedades antioxidantes. Se ha visto que son capaces de inactivar radicales libres, además de presentar un efecto sinergista con antioxidantes como el α -tocoferol (Marcuse, 1960; Karel y cols., 1975; Kikugawa y cols., 1991; Decker y cols., 2000).

La capacidad de los aminoácidos para reducir la oxidación se ve influenciada por la concentración y principalmente por el pH del medio. En un estudio realizado por Marcuse (1960), se determinó la actividad antioxidante de varios aminoácidos de los cuales la histidina fue la más efectiva. Se evaluaron dos valores de pH (7.5 y 9.5) a diferentes concentraciones de los aminoácidos. Al aumentar la concentración de los aminoácidos, se incrementaba la capacidad antioxidante, sin embargo a partir de cierta concentración (diferente para los distintos aminoácidos) se veía disminuida. Los mejores resultados se obtuvieron a pH 7.5, ya que a pH 9.5, sus propiedades antioxidantes se redujeron, incluso

la cisteína se comportó como pro-oxidante en todas las concentraciones evaluadas a este pH.

Zhou y Decker (1999), estudiaron el efecto de algunos aminoácidos y di-péptidos sobre la disminución de hexanal (uno de los principales compuestos formados durante la oxidación de ácidos omega-6 y omega-3). Estos autores encontraron que los di-péptidos fueron más efectivos que los aminoácidos para reducir el hexanal. Debido a que la capacidad antioxidante de algunos péptidos fue mayor al compararlos con sus aminoácidos constituyentes, concluyeron que el enlace peptídico tiene un efecto benéfico al respecto.

Carnosina. Este compuesto es un dipéptido formado de N-β-alanil y L-histidina que se encuentra en el músculo esquelético. Es uno de los péptidos más estudiados en cuanto a actividad antioxidante. Diversos estudios (Chan y cols., 1994; O'Neill y cols., 1998; Yen y cols., 2002b; Wu y cols., 2003) han demostrado que la carnosina inhibe la oxidación lipídica atrapando radicales libres y quelando metales. Estas propiedades se han atribuido principalmente su residuo de histidina, incluso se han propuesto algunos modelos ilustrando el mecanismo mediante el cual secuestra metales (Baran, 2000; Fig. 4).

Wu y cols. (2003), evaluaron la actividad antioxidante de la carnosina, anserina (N-β-alanil y L-3-metil-histidina), algunos aminoácidos libres y la combinación de todos estos. Usaron 3 sistemas modelo para evaluar tanto la función como antioxidante primario, atrapando radicales libres, así como su capacidad para quelar metales. Encontraron que ambos dipéptidos; la carnosina y anserina fueron capaces de inhibir la oxidación en un sistema de ácido linoleico, 10.66 y 3.3%, respectivamente. La capacidad de la carnosina para inactivar radicales libres fue de 44% y la anserina de 50.6%. Estos compuestos demostraron una capacidad para atrapar iones Cu^{+2} de 62.5 y 31.3%, respectivamente. Sin embargo, al evaluar por separado los aminoácidos que componen estos péptidos, y algunas combinaciones, en general mostraron ser menos eficaces en los sistemas modelo utilizados.

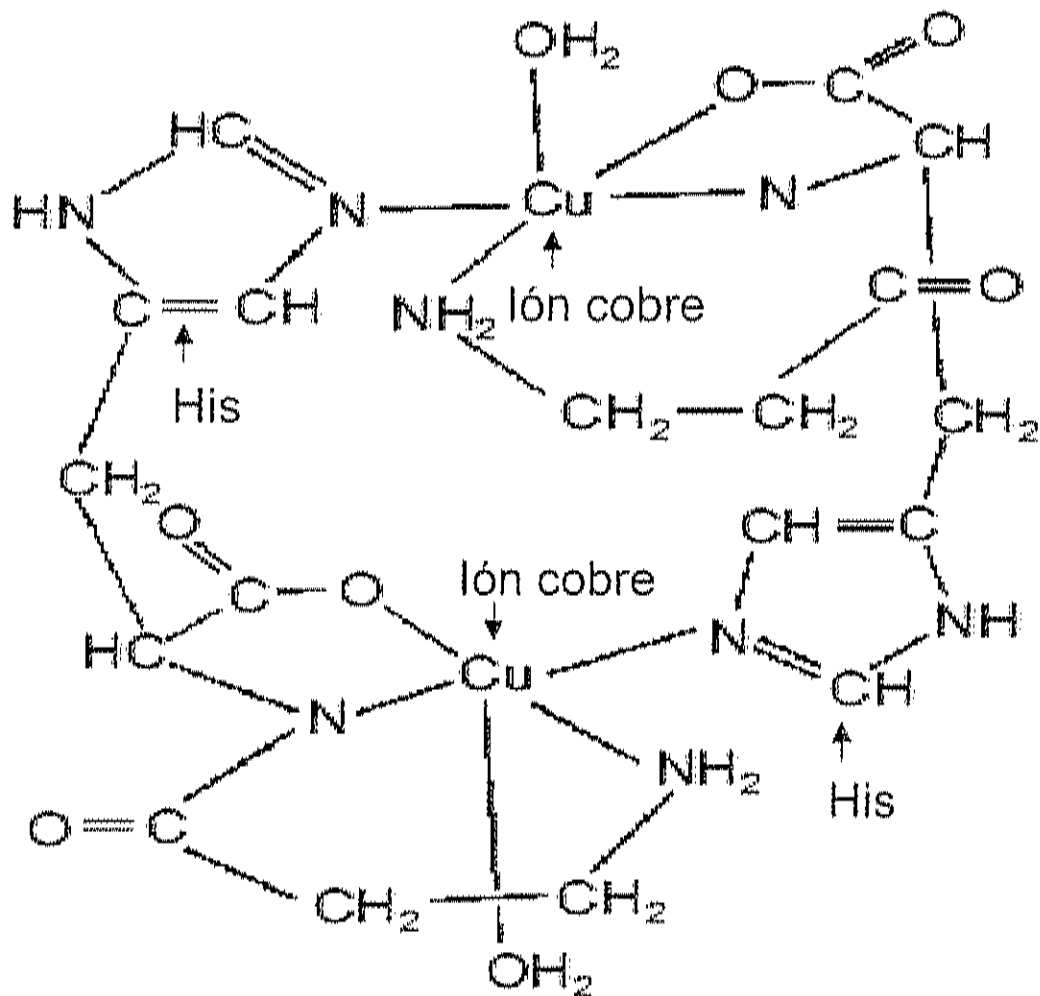


Fig. 4. Complejo propuesto para la actividad quelante de la carnosina, en este caso con el cobre (Baran, 2000).

Se ha reportado que la actividad quelante de la histidina presente en la carnosina depende del tipo de ión metálico. Esta tiene más facilidad para formar un complejo (quelar) con iones cobre que con iones hierro (Decker y cols., 1992).

Proteínas de suero de leche. Se han realizado estudios que han mostrado la habilidad de las proteínas de suero de leche y sus hidrolizados para inhibir la oxidación (Colbert y Decker, 1991; Browdy y Harris, 1997; Tong y cols., 2000; Peña-Ramos y Xiong, 2001; O'Sullivan y cols., 2004). Colbert y Decker (1991), evaluaron la capacidad antioxidante de estas proteínas y sus componentes separados mediante ultrafiltración (UF), en un sistema modelo de liposomas. Las proteínas de suero de leche inhibieron hasta en un 90% la oxidación de liposomas. Al evaluar los productos obtenidos con la UF, encontraron que las fracciones proteicas del suero que conferían la mayor parte de la capacidad antioxidante tenían un rango de peso molecular de 500-5000 Da.

Tong y cols., (2000), estudiaron la capacidad antioxidante de fracciones proteicas de suero de alto (HMW, >3500 Da) y bajo peso molecular (LMW, <3000 Da) en un sistema de emulsión de aceite de salmón. A diferencia de lo encontrado por Colbert y Decker (1991), en este estudio se encontró que la HMW mostró una capacidad antioxidante mayor que la LMW, presentando 86 y 58% inhibición oxidativa, respectivamente.

En otro estudio, Peña-Ramos y Xiong (2001), hidrolizaron proteína de suero con varias enzimas (puras y crudas). A las fracciones obtenidas se les evaluó su capacidad para inhibir la oxidación en un sistema modelo de liposomas, obteniendo los mejores hidrolizados con las enzimas crudas (hasta un 40% inhibición oxidativa). En este estudio no se encontró una relación entre el grado de hidrólisis y la actividad antioxidante que presentaron los diferentes hidrolizados. Por lo anterior, concluyeron que la capacidad antioxidante está más relacionada con la composición de las fracciones proteicas en los

diferentes hidrolizados, la cual está dictada por la especificidad de la proteasa utilizada.

Peña-Ramos y cols. (2004), trabajaron con proteína de suero de leche, esta vez, se hidrolizó y fraccionó mediante cromatografía de filtración en gel. En este caso la actividad antioxidante de las fracciones proteicas se evaluó también en un sistema modelo de liposomas. Las fracciones más efectivas fueron las de menor tamaño molecular, encontrando una fracción de ~750 Da, con una capacidad para inhibir la oxidación lipídica de 55%. Los autores realizaron un análisis multivariado, con el que concluyeron que la capacidad antioxidante estaba relacionada positivamente con su peso molecular (bajo) y con la presencia de histidina y algunos aminoácidos hidrofóbicos (Ile, Val, Leu).

Proteína de soya. Se ha demostrado el potencial antioxidante de la proteína de soya y sus hidrolizados en diferentes sistemas modelos y alimenticios (Bishov y Henick, 1972; Yee y cols., 1980; Chen y cols., 1995; Hirose y Miyashita, 1999; Peña-Ramos y Xiong, 2002; O'Sullivan y cols., 2004). Este efecto se ha atribuido a su capacidad de atrapar radicales libres y a la habilidad de algunos hidrolizados para formar una membrana alrededor de los lípidos. Se cree que esta membrana evita la penetración de iniciadores de la oxidación lipídica.

En un trabajo realizado por Chen y cols. (1995), fue posible separar péptidos antioxidantes de una sub-unidad proteica de soya (β -conglícinina). Encontraron que los péptidos con mayor actividad antioxidante contenían histidina en su secuencia (Leu-Leu-Pro-His-His) y relacionaron el potencial antioxidante de este aminoácido con sus propiedades de atrapar radicales libres y quelar metales. A partir de este estudio, se diseñaron algunos péptidos que contenían estos aminoácidos, para evaluar el efecto de su secuencia sobre sus propiedades antioxidantes. Se concluyó que tanto la composición, como la secuencia tienen efecto sobre la actividad antioxidante de los péptidos (Chen y cols., 1996; Chen y cols., 1998).

Peña-Ramos y Xiong (2002), evaluaron la actividad antioxidante de hidrolizados proteicos de soya obtenidos con diferentes enzimas: puras y crudas, en un sistema modelo liposomal. Las enzimas que produjeron los hidrolizados más eficientes fueron la Flavourzyme^R (enzima cruda) y la quimiotripsina (enzima pura), aumentando hasta en un 33 y 44%, la actividad antioxidante al compararlos con la proteína intacta, respectivamente. En este estudio se concluyó que la hidrólisis con estas enzimas puede mejorar la capacidad antioxidante de la proteína de soya. Por otro lado, una hidrólisis excesiva de la proteína de soya (ej. tratada con papaina) mostró un efecto negativo sobre las propiedades antioxidantes de los hidrolizados. Aunque los hidrolizados mostraron buena capacidad antioxidante, ninguno fue mejor que el galato de propilo, utilizado bajo las mismas condiciones. Según estos investigadores, dentro de los hidrolizados pueden existir compuestos con características pro-oxidantes (péptidos y aminoácidos), que disminuyen su potencial antioxidante.

Otras proteínas de origen animal. En algunos estudios se determinó la capacidad antioxidante de hidrolizados y péptidos obtenidos a partir de proteínas de especies marinas como la merluza, bacalao, lenguado y capelín. En la mayoría de los casos, las especies utilizadas en estos estudios son un sub-producto en el procesamiento de pescado o bien son muy poco consumidas (Amarowicz y Shahidi, 1997; Hattori y cols., 1998; Kim y cols., 2001; Jun y cols., 2004).

Amarowicz y Shahidi (1997), obtuvieron 4 fracciones de un hidrolizado proteico obtenido a partir de capelín y evaluaron su actividad antioxidante en un sistema modelo de emulsión. Encontraron una fracción con buena capacidad antioxidante, sin embargo, las 3 restantes se mostraron muy poco efectivas para inhibir la oxidación de lípidos, incluso una de ellas presentó un efecto pro-oxidante. Concluyeron que las diferencias en las propiedades antioxidantes de las fracciones se podían deber a un sinergismo con el emulsificante (Tween 20)

utilizado en el sistema modelo. Además, determinaron que el efecto prooxidante de una de las fracciones podría ser debido a un compuesto con propiedades reductoras con un grupo tiol en su estructura, el cual podría ser la cisteína.

Kim y cols., en 2001, separaron dos péptidos de un hidrolizado proteico de piel de merluza. Estos mostraron una notable actividad antioxidante en un sistema compuesto por ácido linoleico, comparados con el resto de las péptidos presentes en el hidrolizado. Los péptidos se componían de 13 y 16 residuos de aminoácidos, además, ambos poseían un residuo de Gly en el carbono terminal, con una secuencia repetida de Gly-Pro-Hyp. Estos investigadores, atribuyeron la capacidad antioxidante principalmente a la secuencia de aminoácidos en las fracciones proteicas.

En un estudio realizado por Jun y cols. (2004), se purificó y caracterizó un péptido antioxidante obtenido a partir de un hidrolizado enzimático de proteína de lenguado. Ellos determinaron que el péptido se formaba de 10 residuos de aminoácidos (N-terminal): Arg-Pro-Asp-Phe-Asp-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr. En este trabajo concluyeron que la actividad antioxidante estaba relacionada además de la secuencia de aminoácidos, con el peso molecular de las fracciones peptídicas.

Hattori y cols. (1998), aislaron péptidos de elastina obtenida de ligamento de bovino, los cuales presentaron buenas características antioxidantes, al evaluarlos en un sistema compuesto por ácido oleico. Además, mostraron un efecto sinergista al combinarlo con el ácido cítrico. También evaluaron la capacidad de los péptidos para estabilizar radicales libres, sin encontrar resultados positivos. Por lo anterior, ellos concluyeron que el mecanismo mediante el cual los péptidos prevenían la oxidación probablemente se debía a la habilidad para quelar iones metálicos y a su gran afinidad por el aceite.

Factores que Influyen en la Eficiencia de los Antioxidantes

La capacidad de algunos compuestos para inhibir la oxidación no solo depende de sus características estructurales. Existen otros factores que influyen como la concentración, fase del proceso de oxidación, estado físico del sistema (tipo de alimento), entre otros.

Concentración. La concentración en la que un antioxidante es añadido a un sistema puede ser un factor determinante en su eficiencia para inhibir la oxidación. Como ya se mencionó anteriormente, el ácido ascórbico puede actuar como pro-oxidante a bajas concentraciones. Otro ejemplo es el de los tocoferoles, los cuales a diferencia del ácido ascórbico, pueden actuar como pro-oxidantes cuando se añaden en altas concentraciones.

Fase de la oxidación. La concentración inicial de productos primarios de la oxidación como los peróxidos, reduce fuertemente la eficiencia del antioxidante añadido al sistema que está siendo estabilizado (Yanishlieva, 2001).

Estado físico del sistema lipídico. El comportamiento de un antioxidante se ve afectado por el estado de los lípidos o alimentos que contienen lípidos. Tanto en sistemas alimenticios como en biológicos, se presenta un patrón contradictorio del comportamiento de los antioxidantes. El hecho de que los antioxidantes polares sean más efectivos en lípidos o aceites puros y los antioxidantes no-polares en sustratos polares como liposomas y emulsiones se denomina "paradoja polar". En los aceites puros los antioxidantes polares se orientan en la interfase aceite-aire, protegiendo al lípido del ataque de radicales, mientras que el antioxidante no-polar queda disuelto en la fase lipídica. Por el contrario, en los sistemas de emulsiones, el antioxidante de carácter hidrofóbico es orientado en la interfase aceite-agua, donde son más eficientes (Porter y cols., 1989; Huang y cols., 1997).

Existen estudios donde se evalúa la efectividad de algunos antioxidantes en sistemas compuestos por aceite puro y emulsiones. Frankel y cols. (1994),

demonstraron que el α -tocoferol (antioxidante lipofílico) es más efectivo en un sistema de emulsión aceite-agua, al compararlo con un sistema compuesto solo de aceite. Por el contrario, el Trolox C (análogo del α -tocoferol, soluble en agua) mostró mayor capacidad antioxidante en el sistema de aceite puro. En otro estudio, se obtuvieron resultados similares al comparar la efectividad del ácido carnósico (más efectivo en aceite puro) y el carnosol (más efectivo en el sistema de emulsión). En este caso, al igual que en otros estudios, este comportamiento se atribuyó a la diferencia en polaridad de estos dos compuestos, ya que el ácido carnósico es más polar que el carnosol (Frankel y cols., 1996). Por lo anterior, es importante conocer las características de solubilidad e hidrofobicidad del compuesto antioxidante que deseamos añadir a un sistema alimenticio.

Hidrólisis de Proteínas

Anteriormente ya se mencionó la importancia de la hidrólisis para modificar las propiedades antioxidantes de diferentes sustratos proteicos, donde dicha hidrólisis tiene un efecto benéfico (Yee y cols., 1980; Chen y cols., 1995; Peña-Ramos y Xiong, 2001; Peña-Ramos y Xiong, 2002). En la industria de alimentos se han utilizado los hidrolizados proteicos y productos derivados para diferentes fines. El proceso hidrolítico es implementado con el propósito de mejorar calidad nutricional, retardar el deterioro, incrementar o disminuir solubilidad, agregar propiedades de coagulación y espumado, remover malos olores o sabores, además de sustancias tóxicas (Lahl y Braun, 1994; Guadix y cols., 2000).

La hidrólisis de proteínas se puede llevar a cabo mediante tratamientos ácidos, alcalinos o bien, enzimáticamente. La hidrólisis con soluciones ácidas o alcalinas es muy difícil de controlar, además puede destruir los L-aminoácidos y

dar lugar a la formación de D-aminoácidos y compuestos tóxicos como la lisino-alanina. Por lo anterior, el método enzimático es preferido por encima de los métodos estrictamente químicos. En este método, una de las principales ventajas es la capacidad para poder controlar el proceso hidrolítico y producir hidrolizados con cierto perfil de aminoácidos, mediante el uso de proteasas específicas (Lahl y Braun, 1994).

Proteasas

El uso de enzimas permite controlar el proceso de hidrólisis y por lo mismo, las propiedades de los productos resultantes. La habilidad de las enzimas para hidrolizar un sustrato proteico es muy variable, por lo que su elección es esencial para obtener compuestos con determinadas características nutricionales y fisicoquímicas (Clemente, 2000).

Las proteasas son enzimas que catalizan la degradación hidrolítica de una cadena polipeptídica. Estas se pueden clasificar de acuerdo a su fuente de origen (plantas, animales, microorganismos), su acción catalítica (endopeptidasas o exopeptidasas) o la naturaleza de su sitio catalítico. En la hidrólisis de proteínas alimenticias regularmente se utilizan las endopeptidasas, pero en ocasiones se combinan con exopeptidasas, para llevar a cabo una hidrólisis más exhaustiva (Alder-Nissen, 1986).

Endo-peptidasas. Estas enzimas rompen los enlaces localizados dentro de la cadena polipeptídica. Existen 4 clases principales: serina-proteasas, cisteína-proteasas, aspártico-proteasas y metaloproteasas. Su nombre implica que poseen residuos de serina, cisteína y ácido aspártico, respectivamente, como parte esencial de su sitio catalítico (Alder-Nissen, 1993).

Las cisteína-proteasas, regularmente son más eficientes a pH neutro, las aspártico-proteasas como la pepsina, tienen su actividad máxima a pH ácido y

las serina-proteasas como la tripsina y quimiotripsina, de acuerdo al pH de la región donde son excretadas (duodeno), son más efectivas a pH's alcalinos. Estas últimas tienen preferencia para cortar el enlace peptídico en residuos de Lys-, Arg-COOH y Phe-, Tyr-, Trp-COOH, respectivamente (Stryer, 1988; Alder-Nissen, 1993). Las metaloproteasas contienen un átomo de algún metal, regularmente Zn en su sitio catalítico, con un pH óptimo cerca del neutro (Alder-Nissen, 1986).

Exo-peptidasas. Este tipo de enzimas tienen especificidad por romper enlaces peptídicos de los residuos de aminoácidos localizados en el N-terminal (aminopeptidasas) y C-terminal (carboxipeptidasas). El Ca^{+2} estabiliza estas proteasas, por lo que algunos agentes quelantes como el EDTA, son capaces de inactivarlas. Estas enzimas se presentan o son producidas comúnmente en microorganismos (Alder-Nissen, 1993).

Grado de Hidrólisis

Para controlar la hidrólisis de proteínas es necesario tener una medida de la magnitud de la degradación hidrolítica. El grado de hidrólisis (GH), es la cantidad de enlaces peptídicos rotos durante la hidrólisis (h), con respecto al número total de enlaces peptídicos que posee una determinada proteína (h_{tot}), dado en meqv/g proteína, por lo que:

$$\text{DH} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100$$

Cuando un enlace peptídico se rompe, se libera un grupo carboxilo y uno amino, los cuales se ionizarán dependiendo del pH de la reacción. El número de

enlaces peptídicos rotos se puede calcular determinando el incremento en los grupos α -amino liberados (Adler-Nissen, 1986).

Existen algunos métodos para determinar el número de grupos amino mediante titulación con formol o la reacción con ninhidrina. Entre los métodos más aceptados actualmente está la determinación de los grupos amino por medio de la reacción con ácido trinitrobenzilsulfónico (TNBS). Una versión muy particular de este método fue desarrollada hace algunos años por Adler-Nissen (1979). Las principales desventajas de este método son la escasa reacción del TNBS con la prolina e hidroxiprolina y la reactividad con los grupos ϵ -amino de la lisina. Entre las ventajas con otros métodos similares están el tiempo de incubación y la estabilidad de los productos de la reacción (Silvestre, 1997).

Ultrafiltración en el Fraccionamiento de Proteínas

La UF se ha estudiado y probado en una gran variedad de proteínas, como la de soya, suero de leche, girasol, entre otras con el propósito de mejorar sus características y propiedades funcionales (Colbert y Decker, 1991; Chiang y cols., 1999; Jeon y cols., 1999; Calderón de la Barca y cols., 2000).

Este método de filtración es un proceso de separación en el cual una solución fluye bajo presión sobre una membrana. El gradiente de presión a través de la membrana fuerza al solvente y especies moleculares pequeñas a través de los poros, mientras que las moléculas más grandes son retenidas. Por ser un proceso donde se da un flujo tangencial de la solución a filtrar, se evitan taponamientos por acumulación de los solutos sobre la superficie filtrante. Durante la UF, el remanente tendrá parte de los solutos permeables, de hecho, la concentración de estos puede ser igual o mayor que la que exista en el permeado. Sin embargo, ya que los compuestos retenidos tendrán un volumen mucho más pequeño que el de alimentación, se dice que hay un efecto de

purificación de las especies que no logran atravesar la membrana (Cheryan, 1998).

La UF se utiliza en la separación de moléculas grandes, tales como polímeros naturales (proteínas, almidón y gomas) y compuestos dispersos de forma coloidal como arcillas, pigmentos y partículas de látex. Este proceso tiene la ventaja de que permite trabajar a bajas presiones, con lo cual los costos de equipo y operación (bombeo) se disminuyen considerablemente. Otra ventaja de este proceso comparado con otros similares, es que no existe un cambio en la fase o estado del solvente durante el proceso de eliminación de agua y puede ser operado a temperatura ambiente (Cheryan, 1998).

En un estudio realizado por Calderón de la Barca y cols. (2000), se modificó enzimáticamente un aislado proteico de soya y el hidrolizado se separó por ultrafiltración, para evaluar algunas de sus propiedades. Dichas propiedades se mejoraron con el proceso de ultrafiltración y se obtuvieron fracciones con una adecuada composición de aminoácidos, baja alergenicidad, alta solubilidad, baja hidrofobicidad de superficie, buena capacidad emulsificante y claridad. Estas características los convertía en buenas opciones para ser utilizadas en formulaciones para niños o bebidas fortificadas, entre otras.

Jeon y cols. (1999), sometieron a ultrafiltración un hidrolizado obtenido enzimáticamente de proteína de bacalao para caracterizar las diversas fracciones separadas. Ellos encontraron que se mejoraban algunas propiedades del hidrolizado como actividad emulsificante, espumado, y actividad antioxidante. Enfocándonos a actividad antioxidante, se han realizado otros estudios donde se ha utilizado la ultrafiltración para mejorar la capacidad de algunas proteínas o hidrolizados proteicos para inhibir la oxidación lipídica (Colbert y Decker, 1991; Chiang y cols., 1999; Tong y cols., 2000; Jun y cols., 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

Hidrólisis Enzimática

Se hidrolizó un aislado proteico de soya (APS) comercial, SUPRO-595 (Du Pont, México, D.F.) con una enzima cruda, Flavourzyme^R (BIOTECSA, S.A. de C.V.) y una enzima pura, quimiotripsina (tipo II, de páncreas bovino, Sigma Co., St. Louis, MO). Para esto, se preparó una solución del aislado al 3% de proteína y se sometió a un tratamiento térmico (90°C, 5 min, Peña-Ramos y Xiong, 2002). Se ajustó el pH al valor óptimo para cada enzima (pH 7, para la enzima cruda y pH 8 para la enzima pura). Posteriormente se llevó a cabo la hidrólisis enzimática en un baño de agua Orbit (Lab-Line, Instruments, Melrose Park, IL) con agitación leve, durante 1 h para Flavourzyme^R y 0.5 h para quimiotripsina. La concentración de enzima en la mezcla de reacción fue 1:100 con respecto a la concentración de proteína y la temperatura de incubación de 37 y 50°C para la quimiotripsina y la Flavourzyme^R, respectivamente. Ambas enzimas se inactivaron al calentar las soluciones a 90°C, durante 5 min, enfriando en un baño con hielo. El grado de hidrólisis (GH) se midió con la técnica del ácido trinitro-bencil-sulfónico (Adler-Nissen, 1979).

Ultrafiltración

Los hidrolizados obtenidos se sometieron a ultrafiltración en membranas de celulosa regenerada con cortes de 50, 10, y 3 kDa, en un ultrafiltrador Millipore (Bedford, MA). Los permeados de cada membrana se pasaron a la siguiente de menor tamaño de corte, para obtener fracciones peptídicas del

APS hidrolizado con Flavourzyme^R denominadas: F1, retenido de la membrana de 50 kDa; F2, permeado de la membrana de 50 kDa; F3, permeado de la membrana de 10 kDa y F4, permeado de la membrana de 3 kDa. Para el hidrolizado obtenido con quimiotripsina se obtuvieron de igual manera 4 fracciones, denominadas: Q1, Q2, Q3 y Q4.

Para facilitar su manejo y almacenamiento, las diferentes fracciones obtenidas se liofilizaron en un equipo de vasos LABCONCO, FREEZONE 6 (LABCONCO Co., Kansas City, MI), a -52°C y 8 mBars. Posteriormente se determinó el contenido de proteína por el método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1990) en un equipo de digestión y destilación LABCONCO (LABCONCO Co., Kansas City, MI), tomando el factor de conversión 6.25 reportado para la soya (Adler-Nissen, 1986).

Caracterización Parcial de los Péptidos

Electroforesis en Gel de Poli-acrilamida (SDS-PAGE)

Para verificar el perfil electroforético de los péptidos, se siguió la técnica descrita por Schagger y Von-Jagow (1987), utilizada para detectar proteínas y péptidos en el rango de 1-100 kDa. Se utilizó una cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). En esta técnica se utiliza un gel de separación (16.5% T, 3% C), y un gel superior (4% T, 3% C). El APS y las distintas fracciones proteicas fueron disueltos en el búfer muestra que contenía: Tris HCl 100 mM, pH 6.8, SDS 1%, 2-mercaptoetanol 4%, azul brillante G 0.02% y glicerol 24%. En cada pozo se cargaron 15 μg del APS, los hidrolizados y las fracciones F1 y Q1, y 40 μg de las fracciones 2, 3 y 4, obtenidas con ambas enzimas. La tinción se llevó a cabo con azul de Coomassie.

Composición de Aminoácidos

La concentración de aminoácidos presentes en las fracciones peptídicas se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en fase reversa, usando la técnica reportada por Vázquez-Ortiz y cols. (1995). En esta técnica se lleva a cabo una hidrólisis de la muestra con HCl 6 N, a 150°C durante 6 h, previo a la determinación en el cromatógrafo. Se usó el *orto*-ftaldehído como agente derivatizador y el estándar interno fue el ácido α -aminobutírico que se agregó a la mezcla de estándares de aminoácidos y a las muestras. La fase móvil con un flujo de 1.7 ml./min, estaba formada por el solvente A: búfer de acetato de sodio 0.1 M-tetrahidrofurano (1%) y el solvente B: metanol, usando gradiente de elusión, con una bomba Varian, 9010. Se usó una columna Microsorb Shortone RP, de 10 cm de largo, 4.6 mm de diámetro interno, con partículas de 3 μ m y el empaque con una fase unida de octadecil-silano. La detección se realizó por fluorescencia, a 340 y 455 nm para excitación y emisión, respectivamente, en un detector Varian Fluorichrom II. Siguiendo esta metodología se lograron detectar y cuantificar 15 aminoácidos en las diferentes muestras proteicas.

Se realizó la determinación de cisteína por separado, ya que para esta es necesario llevar a cabo una oxidación con ácido perfórmico, previo a la hidrólisis con HCl 6 N (Umagat y cols., 1982). Con esta modificación y siguiendo la técnica antes mencionada para los otros 15 aminoácidos, fue posible detectar y cuantificar la cisteína.

Hidrofobicidad de superficie

Para este análisis se usó el ácido *cis*-parinámico (CPA) (Sigma Co. St. Louis, MO) como fluoróforo de prueba, según la técnica descrita por Kato y

Nakai (1984). Se prepararon soluciones de 1 mg/mL de cada muestra proteica en búfer de fosfatos 0.01 M, pH 7 y se mantuvieron durante 2 h a 20 °C en un agitador Orbit (Lab-Line, Instruments, Melrose Park, IL) con agitación leve. Después se centrifugaron a 8000 x g por 20 min a 20°C en una centrifuga IEC Centra-GP8R (International Equipment Co., Needham, MA) y se midió la concentración de proteína en el sobrenadante por el método de Lowry y cols. (1951). El sobrenadante de cada muestra fue diluido serialmente de 0.0062-0.1 mg de proteína/mL de búfer de fosfato. Las soluciones (2 mL) se mezclaron con 10 µL de CPA (3.6 mM en etanol con BHT en la misma proporción). La intensidad de fluorescencia (IF) se midió a una longitud de onda de 325 y 420 nm para excitación y emisión, respectivamente, en un espectrofluorómetro QM-2000-4 (Photon Technologies International, CANADA). En este análisis, el índice de hidrofobicidad de la proteína es igual a la pendiente obtenida al graficar la IF de la muestra *versus* concentración.

Solubilidad

Para determinar la solubilidad de las fracciones proteicas se utilizó el Índice de dispersibilidad de proteína, de acuerdo a Saeed y Cheryan (1988). El método consiste en preparar soluciones de las muestras en agua destilada (20 mg en 20 mL) a pH 7, ajustado con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Se agitó a temperatura ambiente durante 30 min para después centrifugarse a 1200 x g, 10 min en una centrifuga Beckman, modelo J2-21 (Palo Alto, CA) y se midió la concentración de proteína en el sobrenadante por el método de Lowry y cols. (1951). La solubilidad se reporta como el porcentaje de proteína en el sobrenadante en relación al contenido de proteína total.

Actividad Antioxidante

Sistema Modelo de Liposomas

La actividad antioxidante se evaluó en un sistema modelo de liposomas de fosfatidilcolina (Sigma Co., St. Louis, MO), preparados siguiendo la técnica descrita por Decker y Hultin (1990). Se disolvieron 0.3 g de fosfatidilcolina de soya en 40 mL de búfer (histidina 5 mM-cloruro de potasio 0.12 M, pH 6.8). La solución se sonicó durante 20 min en un equipo Bransonic-450 (VWR Scientific Instruments, Eagle Road, Danbury, CT). Durante la sonicación, el recipiente que contenía la solución de fosfatidilcolina se colocó en un baño de hielo, para evitar el calentamiento. La solución se centrifugó a 12000 x g, 15 min a 4°C en una centrifuga Beckman, modelo J2-21 (Palo Alto, CA). Los liposomas se cuantificaron midiendo la cantidad de fosfato mediante el método reportado por Anderson y Davis (1982).

El sistema modelo se preparó con búfer salino ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 3.4 mM-NaCl 0.15 M, pH 7.0), donde se agregaron 0.01 mg/mL de liposomas, además de las diferentes fracciones peptídicas al 0.5% p/v. La oxidación de los liposomas se inició agregando FeCl_3 (15 μM) y ácido ascórbico (0.1 mM). La reacción se llevó a cabo a 37°C, en baño de agua Orbit (Lab-Line, Instruments, Melrose Park, IL) con agitación leve por 1 hora. Como control se sustituyó la solución proteica por agua destilada.

La oxidación de lípidos se midió determinando la concentración de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS) (McDonald y Hultin, 1987). Se mezcló 1 mL del sistema modelo con 2 mL de una solución de ácido tiobarbitúrico 0.375%-ácido tricloroacético 15% -ácido clorhídrico concentrado (50:50:1.7). A esta mezcla se agregó 0.1 mL de BHT (2% en etanol absoluto) y se hirvió por 15 min. Posteriormente se centrifugó por 15 min a 1600 x g en un centrifuga IEC Centra-GP8R (International Equipment Co., Needham, MA). Se

leyó la absorbancia del sobrenadante a 532 nm, en un espectrofotómetro Perkin Elmer, Lambda 3B (Norwalk, CT) y el porcentaje de inhibición oxidativa se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left[1 - \frac{AM}{AC} \right] \times 100$$

donde:

AM= Absorbancia de la muestra

AC= Absorbancia del control

Reducción de Radicales Libres

También se determinó la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas al evaluar su capacidad para atrapar radicales libres, utilizando el radical α, α -difeníl- β -picrahidrácil (DPPH) (Bersuder y cols., 1998). Se mezclaron 4 mL de las diferentes muestras proteicas al 0.01% con 1 mL de una solución de DPPH 0.1 mM en etanol absoluto. Las mezclas se incubaron durante 1 h a 25°C, protegiéndolas de luz y eliminando el oxígeno presente, mediante flujo de nitrógeno. Se leyó la absorbancia de la muestras a 517 nm, en un espectrofotómetro Perkin Elmer, Lambda 3B (Norwalk, CT) y la actividad anti-radical se midió como el porcentaje de desaparición del color púrpura inicial de una solución de DPPH 0.1 mM.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Los datos se analizaron en un diseño completamente al azar, con 11 muestras proteicas: proteína intacta (APS), proteína hidrolizada (con quimiotripsina, QH y con Flavourzyme[®], FH) y las fracciones 1, 2, 3 y 4. Se realizó un análisis de varianza y las comparaciones de medias por la prueba de Tukey, con un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$).

También se llevó a cabo un análisis multivariado (correlación y regresión múltiple) para evaluar el efecto de las propiedades de las fracciones peptídicas (composición de aminoácidos, hidrofobicidad, solubilidad) sobre su actividad antioxidante (medida en el sistema modelo) y su capacidad para atrapar radicales (medida con el radical libre DPPH). Los análisis se realizaron con el paquete computacional NCSS, versión 2000.

RESULTADOS

Hidrólisis Enzimática

Se realizó un ensayo preeliminar donde se evaluó la actividad antioxidante de hidrolizados proteicos de soya obtenidos con diferentes enzimas y con distintos tiempos de hidrólisis. De acuerdo a este ensayo preeliminar, los GH's adecuados para producir hidrolizados con una buena actividad antioxidante fueron: de 8.79% y 5.82% para la Flavourzyme^R y quimiotripsina, respectivamente (considerada como hidrólisis leve, Mahmoud, 1994). Se ha reportado que una hidrólisis excesiva puede afectar negativamente las propiedades antioxidantes, incluso producir hidrolizados con características pro-oxidantes (Peña-Ramos y Xiong, 2002).

La diferencia en el GH entre enzimas se debió no solo al tiempo de hidrólisis, sino a la capacidad de estas para romper las cadenas poli-peptídicas. La quimiotripsina es una enzima más específica comparada con la Flavourzyme^R, ya que la primera solo rompe enlaces peptídicos en sitios con Phe-, Tyr-, Trp-COOH. Por su parte, la Flavourzyme^R es una mezcla de endo- y exo-peptidasas, que se recomienda para hidrólisis de moderadas a extensas (Novo-Nordisk, 1995).

Ultrafiltración

Las fracciones proteicas obtenidas durante el proceso de ultrafiltración de los hidrolizados fueron liofilizadas su uso posterior. La concentración de proteína medida por el método de micro-Kjeldahl para cada fracción liofilizada se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentración de proteína total (base húmeda) del APS y las distintas fracciones proteicas obtenidas por ultrafiltración^{1,2,3}.

| Fracción | % de proteína (N x 6.25) |
|----------|-----------------------------|
| APS | 82.89±0.33 ^{cd} |
| FH | 81.77±1.36 ^{da} |
| F1 | 85.56±0.02 ^b |
| F2 | 79.29±0.02 ^f |
| F3 | 71.72±0.53 ^g |
| F4 | 50.02±0.24 ⁱ |
| QH | 82.18±0.26 ^{da} |
| Q1 | 80.54±0.85 ^{ef} |
| Q2 | 88.85±0.07 ^a |
| Q3 | 85.02±0.21 ^{bc} |
| Q4 | 63.22±0.49 ^h |

1. Fracciones obtenidas con Flavourzyme^K: FH: Hidrolizado sin ultrafiltrar, F1: Remanente de la membrana de 50 kDa, F2: Permeado de la membrana de 50 kDa, F3: Permeado de la membrana de 10 kDa, F4: Permeado de la membrana de 3 kDa; Fracciones obtenidas con quimiotripsina: QH: Hidrolizado sin ultrafiltrar, Q1: Remanente de la membrana de 50 kDa, Q2: Permeado de la membrana de 50 kDa, Q3: Permeado de la membrana de 10 kDa, Q4: Permeado de la membrana de 3 kDa

2. Media y desviación estándar de dos replicas

3. Valores con distinto superíndice, son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

En esta tabla, se puede observar un aumento en la concentración de proteína en algunas de las fracciones. Esto se puede deber a que durante el proceso de ultrafiltración se separan compuestos no proteicos de bajo peso molecular, permitiendo este incremento.

Caracterización Parcial de los Péptidos

SDS-PAGE

Los patrones electroforéticos de las diferentes fracciones obtenidas por ultrafiltración, así como la de los hidrolizados y la proteína intacta (APS), se muestran en la Figura 5. En el carril 2, correspondiente al APS (Fig. 5a y 5b), no se observan bandas definidas de las sub-unidades de la β -conglucina (α , α' y β). Estas sub-unidades tienen pesos moleculares por encima de los 50 kDa, y debido a la concentración de acrilamida utilizada, quedaron atrapadas en el gel superior. Las sub-unidades de la glicina: poli-péptido ácido (PA) ~35 kDa y poli-péptido básico (PB) ~20 kDa se observan en una banda muy gruesa, sin embargo sí lograron movilidad. Aunque algunas proteínas no se pudieron observar en bandas definidas, la utilización de un gel con estas características nos permitió observar las bandas correspondientes a las fracciones pequeñas separadas por ultrafiltración.

En el patrón electroforético correspondiente al hidrolizado con FlavourzymeR y sus respectivas fracciones (Fig 5a) se puede observar el desvanecimiento de las bandas en la muestra de hidrolizado (carril 3), con respecto a la proteína intacta (carril 2). Este desvanecimiento era esperado, como consecuencia del tratamiento enzimático que hidroliza a la proteína.

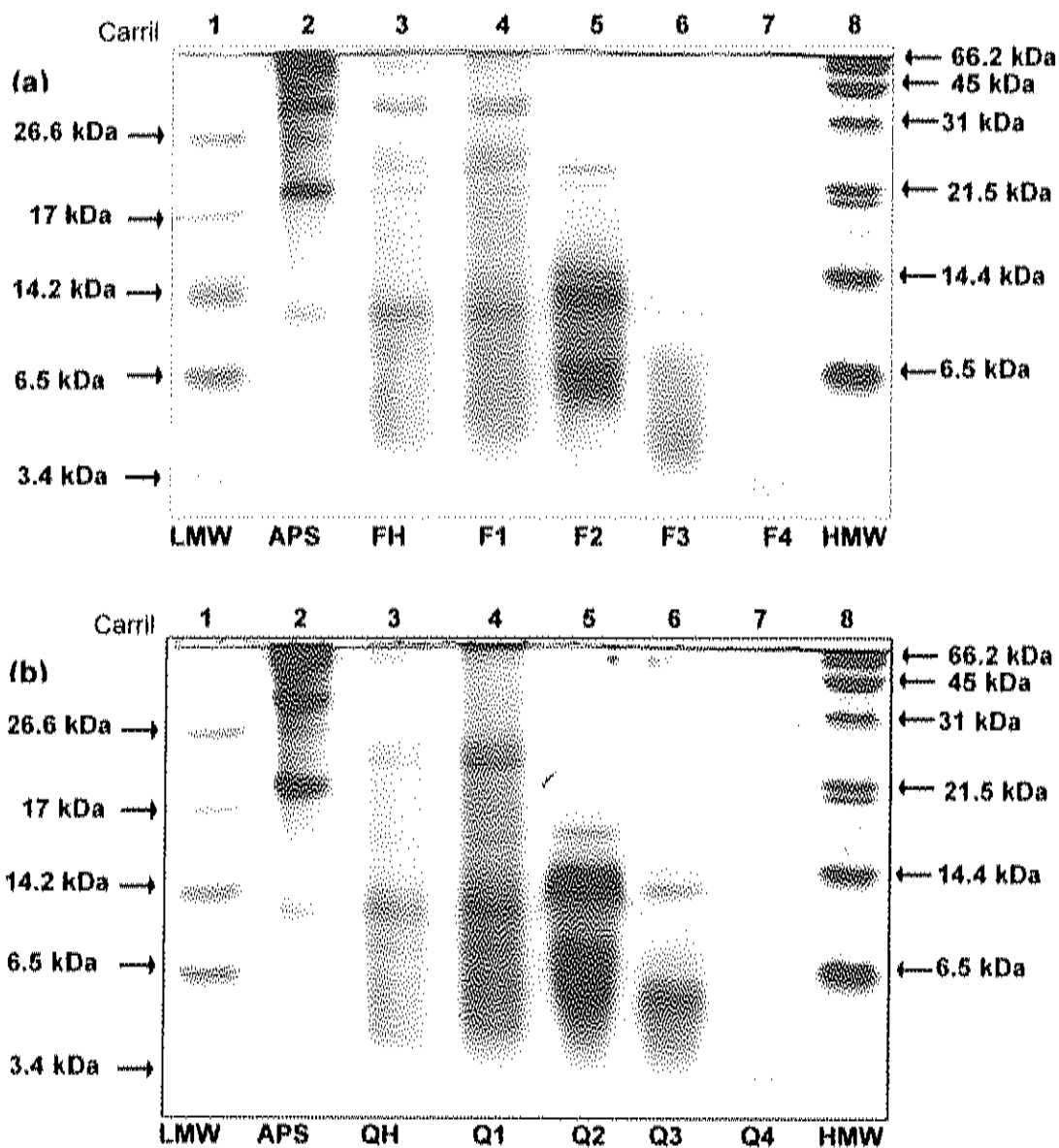


Fig. 5. Electroforesis en geles de poli-acrilamida (SDS-PAGE) de las distintas muestras proteicas. (a) Muestras obtenidas del hidrolizado con Flavourzyme[®]. (b) Muestras obtenidas del hidrolizado con quimiotripsina.

Fracciones obtenidas con Flavourzyme[®]:
 FH: Hidrolizado sin ultrafiltrar
 F1: Remanente de la membrana de 50 kDa
 F2: Permeado de la membrana de 50 kDa
 F3: Permeado de la membrana de 10 kDa
 F4: Permeado de la membrana de 3 kDa
 LMW: Marcador de Peso Molecular Ultra-Bajo

Fracciones obtenidas con quimiotripsina:
 QH: Hidrolizado sin ultrafiltrar
 Q1: Remanente de la membrana de 50 kDa
 Q2: Permeado de la membrana de 50 kDa
 Q3: Permeado de la membrana de 10 kDa
 Q4: Permeado de la membrana de 3 kDa
 HMW: Marcador de Peso Molecular de Amplio Rango

La Flavourzyme^R fue efectiva para hidrolizar las sub-unidades de la β -conglucina, por lo que desaparecieron casi totalmente en el gel. Sin embargo en el mismo carril 3 se observa una banda tenue correspondiente al PB (~20 kDa) y otra, relativamente más fuerte correspondiente al PA (~35 kDa). Lo anterior indica una mayor resistencia de estas sub-unidades al ataque de la Flavourzyme^R, comparadas con las sub-unidades de la β -conglucina. En estudios anteriores, ya se ha reportado dicha resistencia de las sub-unidades de la glicina a la acción enzimática de la Flavourzyme^R (Villanueva y cols., 1999; Peña-Ramos y Xiong, 2002).

El carril 4 (Fig. 5a), correspondiente al retenido de la membrana de 50 kDa, muestra un patrón electrotorético similar al del hidrolizado. En cambio, en el permeado de esta misma membrana (F2, carril 5) se puede observar que algunos péptidos de alto peso molecular (36, 34 y 23 kDa) fueron eficientemente removidos por la ultrafiltración. En F2 quedaron retenidos péptidos de 22, 20, 14.5, 13.5 y 7 kDa. Es posible que el péptido de 22 kDa (observado también en F1) sea producto de la degradación del PA, o bien de alguna de las sub-unidades de la β -conglucina. En cuanto a la banda de 20 kDa, esta posiblemente es parte del PB que no fue hidrolizado totalmente, por lo que se pudo observar aún remanentes en F2.

En el carril 6 (F3), de la Figura 5a se observa una franja continua en un rango de 10.5-3.5 kDa, pero no se pueden advertir bandas definidas de péptidos. Para F4 se puede observar algo similar a F3, con una banda posiblemente formada por péptidos <3.5 kDa.

Las muestras obtenidas al hidrolizar con quimiotripsina (Fig. 5b) mostraron un patrón electroforético similar a las obtenidas con Flavourzyme^R, con algunas diferencias notables. Ambas enzimas fueron efectivas para hidrolizar las proteínas de alto peso molecular, entre las que se encuentran principalmente las sub-unidades de la β -conglucina. Sin embargo en el carril 3 (Fig. 5b), se observa la desaparición de bandas de 20 y 35 kDa, con respecto al

carril 2 (APS). Por lo tanto, la quimiotripsina fue más efectiva para degradar tanto las cadenas de PB, como las de PA de glicinina, al compararla con la Flavourzyme^R.

El hidrolizado con quimiotripsina (QH) presentó un patrón muy similar a Q1 (carriles 3 y 4, respectivamente), lo cual también se observó para FH y F1 (Fig. 5a). Este comportamiento denota que durante el proceso de ultrafiltración con la membrana de 50 kDa, no se lograron separar totalmente las fracciones por debajo de este tamaño de corte, ya que parte de ellas queda en el retenido. Un efecto similar fue observado por Wu y cols. (1998), y lo atribuyeron a la posible unión de péptidos de alto y bajo peso molecular, por medio de atracciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno o enlaces electrostáticos. Para incrementar la eficiencia de separación se deben realizar varios lavados, sin embargo, en el presente trabajo, resultaba muy poco práctico debido al gran volumen de permeado que se obtenía.

La fracción Q2, al igual que la F2, presenta dos bandas de péptidos de 14.5 y 13.5 kDa, sin embargo, en el caso de la fracción obtenida con quimiotripsina, estas bandas son más intensas. Por esto, se puede concluir que estos péptidos están en mayor proporción en Q2 que en F2, ya que ambas fracciones fueron cargadas en el gel a la misma concentración. Además, se puede observar en ambas fracciones, una banda de 7 kDa, no obstante, en Q2 esta banda se extendió desde 5.5 hasta 8.5 kDa. Cabe hacer notar la aparición de una banda de 16 kDa en Q2, la cual no se observó en F2.

Con respecto a Q3 (Fig. 5b), se observan tres bandas bien definidas de 14.5, 13.5 y 5.8 kDa, a diferencia de F3, donde solamente existe una banda continua de 3.5-10.5 kDa. En Q4, al igual que en F4, no se encontraron péptidos por encima de 3.5 kDa, patrón que nos denota la eficiencia de esta membrana para eliminar péptidos por encima de este tamaño de corte.

Las diferencias en el perfil de péptidos de las diferentes fracciones obtenidas a partir de ambos hidrolizados, se debe a la especificidad de las

enzimas utilizadas para cortar en diferentes partes de las cadenas polipeptídicas. Por esto, pueden existir péptidos de diferente tamaño y composición, comparando las fracciones proteicas entre enzimas.

Composición de Aminoácidos

Todas las fracciones que fueron obtenidas por ultrafiltración, los hidrolizados y la proteína intacta (APS) fueron caracterizados en cuanto su composición de aminoácidos, y los resultados se muestran en la Tabla 2.

La concentración de aminoácidos del APS obtenida en el presente estudio fue similar a la especificada por el proveedor, con excepción de la lisina, ya que el proveedor indica una concentración mayor a la determinada en este trabajo. Sin embargo, esta diferencia no se considera de importancia, ya que el objetivo de determinar la composición de aminoácidos fue el de comparar los cambios de concentración entre las diferentes muestras proteicas.

Se encontraron variaciones en la concentración de aminoácidos de algunas fracciones con respecto a los hidrolizados de donde se separaron. Entre las diferencias más notables está la concentración de fenilalanina, que aumentó en las fracciones peptídicas, F4 y Q4, en un 78 y 54%, respectivamente ($p < 0.05$).

En el caso de la leucina, esta aumentó 35% ($p < 0.05$) en la F4, sin embargo, en la fracción Q4, la concentración de este aminoácido no varió significativamente con respecto a QH. Por otro lado, la concentración de tirosina aumentó en la fracción Q4 (62%), pero en la F4 no se observó diferencia ($p > 0.05$) con el respectivo hidrolizado. En esta misma muestra F4, hubo una disminución en la concentración de histidina del 28%, en comparación con FH, sin embargo Q4, presentó un valor igual al del hidrolizado de donde se obtuvo.

Tabla 2. Concentración de aminoácidos del APS y las distintas fracciones proteicas (g/100g proteína)^{1,2,3}.

| | APS | FH | F1 | F2 | F3 | F4 | QH | Q1 | Q2 | Q3 | Q4 |
|-----|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| Asp | 15.52 ^e | 14.48 ^{bcg} | 14.88 ^{abc} | 13.71 ^{de} | 15.29 ^{ab} | 13.28 ^f | 14.82 ^{abc} | 13.71 ^{de} | 14.54 ^{abcd} | 13.64 ^{de} | 14.26 ^{cdg} |
| Glu | 27.72 ^{cd} | 28.62 ^c | 27.02 ^{cd} | 39.57 ^e | 34.78 ^d | 25.87 ^d | 29.01 ^c | 26.95 ^{cd} | 34.54 ^b | 26.88 ^{cd} | 23.52 ^f |
| Ser | 3.36 ^{bc} | 3.18 ^{bc} | 3.51 ^{abc} | 3.28 ^{bc} | 2.79 ^g | 3.73 ^{ab} | 3.67 ^{abc} | 3.60 ^{abc} | 3.07 ^{cd} | 3.40 ^{abcd} | 4.01 ^a |
| His | 2.48 ^e | 2.38 ^e | 2.29 ^{ab} | 2.27 ^{ab} | 1.84 ^{cd} | 1.72 ^d | 2.24 ^{ab} | 2.38 ^e | 2.08 ^{bc} | 2.24 ^{ab} | 2.28 ^{cd} |
| Gly | 3.70 ^{cd} | 4.04 ^{bc} | 3.87 ^{abcd} | 4.61 ^{ab} | 4.51 ^{ab} | 3.14 ^g | 3.91 ^{bcd} | 4.23 ^{abc} | 4.23 ^{abc} | 5.18 ^e | 4.22 ^{bc} |
| Thr | 4.10 ^a | 2.88 ^{de} | 3.19 ^{cd} | 2.56 ^e | 3.24 ^{cd} | 3.24 ^{cd} | 3.74 ^{ab} | 3.20 ^{cd} | 2.88 ^{de} | 3.92 ^e | 3.40 ^{bc} |
| Arg | 9.29 ^c | 9.28 ^c | 9.44 ^{bc} | 7.86 ^d | 7.18 ^e | 9.97 ^b | 9.43 ^{bc} | 9.24 ^c | 9.37 ^c | 9.79 ^{bc} | 11.48 ^f |
| Ala | 4.65 ^b | 4.52 ^{bc} | 4.55 ^{bc} | 3.33 ^f | 4.04 ^{cd} | 4.89 ^{ab} | 4.61 ^b | 4.64 ^b | 3.96 ^d | 5.22 ^e | 4.76 ^{ab} |
| Tyr | 3.65 ^b | 3.00 ^f | 3.58 ^b | 2.08 ^g | 2.05 ^g | 2.95 ^f | 2.97 ^c | 3.67 ^b | 2.08 ^g | 3.74 ^b | 4.87 ^e |
| Met | 1.00 ^{cdg} | 1.25 ^a | 1.27 ^e | 1.03 ^{bcd} | 1.03 ^{bcd} | 1.18 ^{abc} | 1.00 ^{cdg} | 1.36 ^f | 1.20 ^{ab} | 0.93 ^{de} | 0.83 ^e |
| Val | 6.24 ^d | 7.31 ^{abc} | 7.39 ^{ab} | 5.41 ^f | 6.69 ^{cd} | 6.71 ^{bcd} | 6.28 ^d | 7.58 ^e | 6.22 ^d | 6.43 ^d | 6.17 ^d |
| Phe | 4.63 ^d | 4.71 ^d | 4.62 ^d | 3.01 ^g | 4.51 ^c | 8.38 ^e | 4.53 ^d | 4.71 ^d | 3.34 ^e | 5.80 ^f | 7.27 ^b |
| Ile | 5.22 ^{abc} | 5.88 ^e | 5.78 ^{ab} | 4.28 ^d | 5.26 ^{abc} | 5.22 ^{abc} | 5.01 ^{bcd} | 5.97 ^e | 5.16 ^{abc} | 4.84 ^{cd} | 4.90 ^{cd} |
| Leu | 6.37 ^b | 6.18 ^b | 6.21 ^b | 4.01 ^g | 5.07 ^f | 8.38 ^e | 6.46 ^b | 6.25 ^b | 4.71 ^{cd} | 6.57 ^b | 6.51 ^b |
| Lys | 1.19 ^{abcd} | 1.34 ^{ab} | 1.04 ^{bcde} | 1.31 ^{abc} | 0.97 ^{de} | 0.84 ^f | 1.45 ^e | 0.99 ^{cdg} | 1.21 ^{abcd} | 0.74 ^f | 0.77 ^f |
| Cys | 0.89 ^{cd} | 0.95 ^c | 1.34 ^b | 1.67 ^e | 0.75 ^{cd} | 0.49 ^f | 0.87 ^{cd} | 1.53 ^{ab} | 1.40 ^b | 0.69 ^{de} | 0.77 ^{cd} |

1. Fracciones obtenidas con Plevourzyme[®]: FH: Hidrolizado con Plevourzyme[®]; F1: Hidrolizado sin ultrafiltrar; F2: Remanente de la membrana de 50 kDa; F3: Remanente de la membrana de 10 kDa; F4: Permeado de la membrana de 3 kDa; Fracciones obtenidas con quimiotripsina: QH: Hidrolizado sin ultrafiltrar; Q1: Remanente de la membrana de 50 kDa; Q2: Permeado de la membrana de 10 kDa; Q3: Permeado de la membrana de 50 kDa; Q4: Permeado de la membrana de 3 kDa

2. Media y desviación estándar de tres replicas

3. Valores con distinto superíndice entre columnas, son significativamente diferentes (p<0.05)

La concentración de arginina disminuyó notablemente en la fracción F3 (23%), en cambio en Q4 este aminoácido se incrementó aproximadamente 24%. En las fracciones restantes se mantuvo en general, sin ningún cambio importante.

Otro aminoácido que mostró cambios importantes fue la cisteína, con disminuciones principalmente en las fracciones más pequeñas (3 y 4) obtenidas con ambas enzimas. Sin embargo, solo en el caso de F4 y Q3, esta disminución fue significativa comparada con su respectivo hidrolizado. De manera contraria, se presentó un incremento en la concentración de este aminoácido en las fracciones 1 y 2, tanto para la Flavourzyme[®], como para la quimiotripsina ($p < 0.05$).

Así como las diferencias observadas en el patrón electroforético, las variaciones que se obtuvieron en la composición de algunos aminoácidos en las fracciones proteicas, se deben al tipo de enzima utilizada. Dependiendo de la especificidad hidrolítica de la enzima, se generan péptidos con una secuencia y composición de aminoácidos diferentes.

Hidrofobicidad de Superficie

Se ha reportado que la hidrofobicidad superficial de algunas proteínas es una característica que se relaciona con sus propiedades funcionales (Kato y Nakai, 1984, Mahmoud y cols., 1992). Es posible que esta característica tenga también influencia sobre su actividad antioxidante, por lo que se consideró importante su determinación. Los resultados de hidrofobicidad del APS, los hidrolizados y las diferentes fracciones obtenidas mediante ultrafiltración aparecen en la Figura 6.

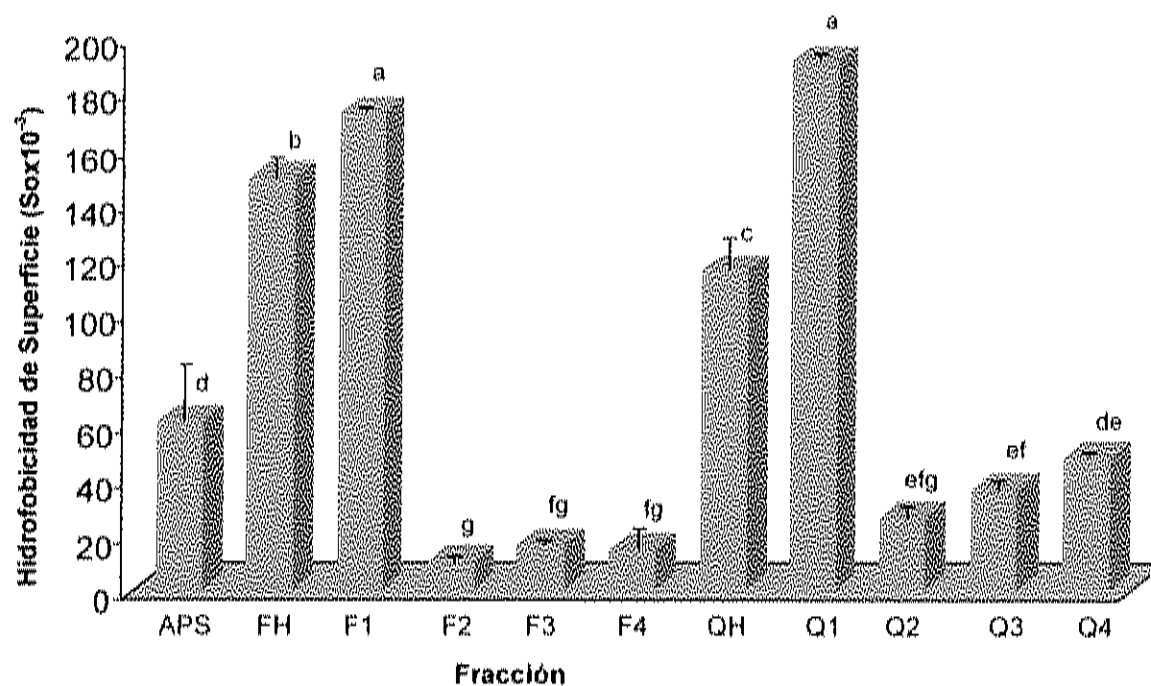


Fig. 6. Hidrofobicidad de superficie del APS, los hidrolizados y las distintas fracciones proteicas obtenidas por ultrafiltración^{1,2,3}.

1. Fracciones obtenidas con Flavourzyme[®]: FH: Hidrolizado sin ultrafiltrar, F1: Remanente de la membrana de 50 kDa, F2: Permeado de la membrana de 50 kDa, F3: Permeado de la membrana de 10 kDa, F4: Permeado de la membrana de 3 kDa; Fracciones obtenidas con quimiotripsina: QH: Hidrolizado sin ultrafiltrar, Q1: Remanente de la membrana de 50 kDa, Q2: Permeado de la membrana de 50 kDa, Q3: Permeado de la membrana de 10 kDa, Q4: Permeado de la membrana de 3 kDa

2. Media y desviación estándar de tres replicas

3. Valores con distinto superíndice, son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Los índices de hidrofobicidad más altos fueron para el APS, los hidrolizados y las fracciones F1 y Q1. En contraste, los valores más bajos se presentaron en las fracciones de menor tamaño molecular (2, 3 y 4, de ambas enzimas, $p < 0.05$).

Existe controversia en cuanto a la hidrofobicidad superficial que presentan las proteínas que son sometidas a procesos hidrolíticos. Algunos autores mencionan que esta característica puede aumentar (Hettiarachchy y Kalapathy, 1997), mientras que otros concluyen que el proceso de hidrólisis puede provocar una disminución de la hidrofobicidad superficial (Mahmoud y cols., 1992). En el presente trabajo, los valores de hidrofobicidad se incrementaron con la hidrólisis del APS. Sin embargo, la ultrafiltración de los hidrolizados produjo fracciones peptídicas (2, 3 y 4 de ambas enzimas) con valores de hidrofobicidad más bajos que el APS y el propio hidrolizado ($p < 0.05$). Anteriormente, se habían reportado resultados similares para la hidrofobicidad de fracciones proteicas de soya obtenidas mediante hidrólisis enzimática y ultrafiltración (Wu y cols., 1998; Calderón de la Barca y cols., 2000). Es importante mencionar que a pesar de que las fracciones más pequeñas (2, 3 y 4 de ambas enzimas) presentaron los valores más bajos, no se observó ninguna tendencia en el cambio en hidrofobicidad de las fracciones con respecto a su tamaño ($p > 0.05$).

Solubilidad

La solubilidad es una de las principales propiedades funcionales y fisicoquímicas de los hidrolizados proteicos y sus productos. Existen estudios donde se ha demostrado que la ultrafiltración de hidrolizados proteicos produce

fracciones peptídicas con buena solubilidad comparada con la muestra de donde fueron separadas (Deeslie y Cheryan, 1991; Wu y cols., 1998).

En la Tabla 3, se presentan los resultados de solubilidad obtenidos a pH 7 en las muestras analizadas. Se puede observar un incremento significativo de la solubilidad del APS después del proceso de hidrólisis con cualquiera de las dos enzimas. Algunos autores mencionan que el aumento en la solubilidad se debe también a la producción de péptidos de tamaño molecular pequeño y a la formación de nuevos grupos amino ($-\text{NH}_3^+$) y carboxilo ($-\text{COO}^-$) libres. Estos grupos formados, son capaces de interactuar con las moléculas de agua, mejorando la solubilidad (Adler-Nissen y Olsen, 1979; Chobert y cols., 1988).

Los valores más bajos de solubilidad se obtuvieron para el APS, los hidrolizados completos y las fracciones F1 y Q1. Las fracciones 2, 3 y 4, de ambas enzimas, mostraron una solubilidad total (100%) y significativamente diferente al APS y los hidrolizados ($p < 0.05$). Como podemos constatar al observar los perfiles electroforéticos (Fig. 5), el proceso de ultrafiltración que produjo estas fracciones, eliminó los compuestos de alto peso molecular que se encuentran presentes tanto en los hidrolizados como en F1 y Q1. Por lo tanto, el incremento en la solubilidad observado en las fracciones 2, 3 y 4, se puede atribuir a la remoción de estos compuestos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Wu y cols. (1998) y Calderón de la Barca y cols. (2000), quienes también evaluaron las características de fracciones peptídicas obtenidas a partir de proteína de soya mediante hidrólisis y ultrafiltración.

Tabla 3. Solubilidad (pH 7) de la proteína intacta (APS), los hidrolizados y las distintas fracciones proteicas obtenidas por ultrafiltración^{1,2,3}.

| Fracción | Solubilidad (%) |
|----------|--------------------------|
| APS | 40.83±1.21 ^f |
| FH | 88.61±0.72 ^c |
| F1 | 75.92±0.50 ^g |
| F2 | 100.00±0.00 ^a |
| F3 | 100.00±0.00 ^a |
| F4 | 100.00±0.00 ^a |
| QH | 92.10±0.80 ^b |
| Q1 | 80.11±0.29 ^d |
| Q2 | 100.00±0.00 ^a |
| Q3 | 100.00±0.00 ^a |
| Q4 | 100.00±0.00 ^a |

1. Fracciones obtenidas con Flavourzyme[®]: FH: Hidrolizado sin ultrafiltrar, F1: Remanente de la membrana de 50 kDa, F2: Permeado de la membrana de 50 kDa, F3: Permeado de la membrana de 10 kDa, F4: Permeado de la membrana de 3 kDa; Fracciones obtenidas con quimiotripsina: QH: Hidrolizado sin ultrafiltrar, Q1: Remanente de la membrana de 50 kDa, Q2: Permeado de la membrana de 50 kDa, Q3: Permeado de la membrana de 10 kDa, Q4: Permeado de la membrana de 3 kDa

2. Media y desviación estándar de tres replicas

3. Valores con distinto superíndice, son significativamente diferentes (p<0.05)

Actividad Antioxidante

Sistema Modelo de Liposomas

En la Tabla 4 se muestran los valores de actividad antioxidante medida como el porcentaje de inhibición de TBARS, en el sistema de oxidación de liposomas catalizado por iones hierro y ácido ascórbico.

En el presente estudio la actividad antioxidante mostrada por el APS fue de 17.74%, la cual es menor a la que presentaron los hidrolizados obtenidos con Flavourzyme[®] y quimiotripsina ($p < 0.05$). Con esto se pudieron corroborar los resultados obtenidos en el trabajo previo realizado por Peña y Xiong (2002), donde se concluye que la actividad antioxidante de un APS se incrementa al hidrolizarlo con cualquiera de estas enzimas. En ambos estudios el incremento en la capacidad antioxidante del APS fue de aproximadamente 30 y 45%, para la hidrólisis con Flavourzyme[®] y quimiotripsina, respectivamente.

La capacidad de FH para inhibir la producción de TBARS en el sistema de liposomas fue de 23.33%. Este valor fue significativamente menor que los obtenidos para las fracciones más pequeñas F3 y F4 ($p < 0.05$) e igual a F1 y F2 ($p > 0.05$). La fracción más efectiva fue F4, la cual mostró una capacidad para inhibir la oxidación de liposomas de 83.20%. Su acción antioxidante, fue aproximadamente 4 veces mayor que la del hidrolizado de donde fue obtenida. Así, las fracciones peptídicas provenientes de FH, mostraron una tendencia a aumentar su capacidad antioxidante a medida que disminuyó su peso molecular.

Tabla 4. Actividad antioxidante de la proteína intacta (APS), los hidrolizados y las distintas fracciones proteicas obtenidas por ultrafiltración^{1,2,3}.

| Fracción | Actividad antioxidante (%) |
|----------|----------------------------|
| APS | 17.74±1.98 ^e |
| FH | 23.33±2.32 ^{de} |
| F1 | 22.04±2.57 ^{de} |
| F2 | 29.98±5.50 ^{cd} |
| F3 | 49.80±4.12 ^b |
| F4 | 83.20±0.64 ^a |
| QH | 25.94±5.26 ^d |
| Q1 | 38.85±5.86 ^{bc} |
| Q2 | 18.21±3.52 ^e |
| Q3 | 25.45±5.28 ^d |
| Q4 | 84.46±0.94 ^a |

1. Fracciones obtenidas con Flavourzyme[®]: FH: Hidrolizado sin ultrafiltrar, F1: Remanente de la membrana de 50 kDa, F2: Permeado de la membrana de 50 kDa, F3: Permeado de la membrana de 10 kDa, F4: Permeado de la membrana de 3 kDa; Fracciones obtenidas con quimiotripsina: QH: Hidrolizado sin ultrafiltrar, Q1: Remanente de la membrana de 50 kDa, Q2: Permeado de la membrana de 50 kDa, Q3: Permeado de la membrana de 10 kDa, Q4: Permeado de la membrana de 3 kDa

2. Media y desviación estándar de tres replicas

3. Valores con distinto superíndice, son significativamente diferentes (p<0.05)

El hidrolizado obtenido con quimiotripsina (QH) mostró una capacidad antioxidante de 25.94%, la cual fue igual o menor a la que presentaron casi todas las fracciones, excepto Q2 ($p < 0.05$). Esto último nos indica que Q2 puede contener algunos péptidos que disminuyen la actividad antioxidante de QH. Por lo tanto, en este caso particular se concluye que la ultrafiltración pudo separar fracciones peptídicas que probablemente actúan como pro-oxidantes dentro del hidrolizado.

Al realizar una comparación de la actividad antioxidante por tipo de enzima, entre cada fracción, se pueden observar diferencias significativas en las fracciones 1, 2 y 3 ($p < 0.05$). Es importante resaltar que la actividad antioxidante de Q1 es prácticamente el doble que la mostrada por F1. Al analizar el patrón electroforético de estas dos fracciones (Fig. 5), una diferencia notoria es que Q1 no contiene la banda de ~35 kDa, la cual, como ya se mencionó, posiblemente corresponda al polipéptido ácido de la glicinina. Así mismo, la habilidad antioxidativa de Q3 es la mitad de la que presentó F3. Una vez más, para estas fracciones se pueden advertir variaciones importantes en sus patrones electroforéticos. Una evidencia de estas diferencias son las bandas definidas en 14.5 y 13.5 kDa que se observan en Q3 y que no aparecen en F3. Además, se puede notar que para estas dos fracciones (Q3 y F3) también se obtuvieron diferencias significativas en la concentración de la mitad de los aminoácidos analizados (Tabla 2).

Las fracciones F4 y Q4 fueron las más efectivas para inhibir la oxidación del sistema modelo liposomal. Estas fracciones fueron las que mostraron el menor contenido de proteína (Tabla 1) en comparación con las otras fracciones obtenidas por ultrafiltración. Algunos de los compuestos que pueden estar presentes en estas fracciones de bajo peso molecular son isoflavonas, ácido fítico y carbohidratos (oligosacáridos). De estos compuestos, tanto las isoflavonas como el ácido fítico se han reportado con propiedades antioxidantes

(Graf y cols., 1987; Barretto y cols., 2003; Ahn y cols., 2004; Kawakami y cols., 2004; Lee y cols., 2004).

Con el propósito de descartar que la actividad antioxidante demostrada por las fracciones F4 y Q4 pudiera deberse a su contenido de isoflavonas, se procedió a determinar la concentración de estos compuestos. A manera de comparación se cuantificó también el contenido de isoflavonas en los hidrolizados de donde fueron obtenidas las respectivas fracciones. Las isoflavonas determinadas fueron la daidzeína y genisteína, por ser las que se presentan en mayor proporción en la soya (Wang y Murphy, 1994). La cuantificación se realizó siguiendo la metodología reportada por Klump y cols. (2001). Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 5, y se observa que para la concentración de la isoflavona daidzeína no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) en las fracciones F4 y Q4, con respecto al hidrolizado de donde fueron obtenidas. Para el caso de la genisteína, tanto en F4, como Q4, se observaron concentraciones menores ($p < 0.05$) comparadas con sus respectivos hidrolizados.

Se ha reportado que el ácido fítico exhibe propiedades para atrapar metales (Graf y cols., 1987; Barretto y cols., 2003; Ahn y cols., 2004). Es importante notar, que estos estudios evaluaron esta propiedad a concentraciones entre 0.8 a 2 mM. Este ácido se encuentra presente en los aislados proteicos de soya en concentraciones bajas (~1.25%). Aún cuando el proceso de ultrafiltración hubiera concentrado todo el ácido fítico en las fracciones F4 y Q4, la concentración que se pudiera obtener estaría por debajo del rango de concentración reportado como efectivo.

Tabla 5. Concentración de isoflavonas de los hidrolizados y las muestras F4 y Q4 (mg/100g proteína)^{1,2,3}.

| Fracción | Isoflavona | |
|----------|-------------------------|-------------------------|
| | Daidzeína | Genisteína |
| FH | 16.02±0.35 ^a | 30.15±0.43 ^a |
| F4 | 13.19±1.12 ^b | 0.00±0.00 ^d |
| QH | 14.66±0.49 ^a | 30.64±0.92 ^a |
| Q4 | 12.68±2.74 ^a | 4.50±0.30 ^c |

1. Fracciones obtenidas con Flavourzyme[®]: FH: Hidrolizado sin ultrafiltrar, F4: Permeado de la membrana de 3 kDa; Fracciones obtenidas con quimiotripsina: QH: Hidrolizado sin ultrafiltrar, Q4: Permeado de la membrana de 3 kDa

2. Media y desviación estándar de tres replicas

3. Valores con distinto superíndice entre filas, son significativamente diferentes (p<0.05)

En el caso de los oligosacáridos, aunque pueden estar presentes en las fracciones más efectivas, no existen reportes con respecto a su posible actividad antioxidante. Basado en los resultados obtenidos del análisis de isoflavonas y la evidencia reportada sobre la actividad antioxidante del ácido fítico, podemos concluir que la actividad antioxidante demostrada por F4 y Q4 se debe principalmente a la fracción proteica contenida en ellas.

Las fracciones más activas como antioxidantes están constituidas por péptidos con un peso molecular por debajo de 3.5 kDa, como consta en la Figura 5a. La obtención de fracciones proteicas antioxidativas dentro de este rango de peso molecular ha sido reportado en algunos trabajos previos. Colbert y Decker (1991), ultrafiltraron suero de leche y obtuvieron una fracción de 0.5-5 kDa con una capacidad antioxidante de 77%, en un sistema oxidativo catalizado por cobre. En otro estudio llevado a cabo por Peña-Ramos y cols. (2004), se obtuvo una fracción de 0.75 kDa a partir de un hidrolizado de suero de leche, la cual demostró tener la habilidad de inhibir la producción de TBARS en liposomas en un 55%.

En estudios como el de Jeon y cols. (1999) y Jun y cols. (2004), se obtuvieron fracciones proteicas con péptidos de peso molecular entre 5-10 kDa y una de 13 kDa, respectivamente. Estas fracciones obtenidas de proteína de pescado, mostraron una actividad antioxidante mayor al hidrolizado de donde se separaron y al resto de las fracciones evaluadas en un sistema modelo de ácido linoleico. De acuerdo a los estudios discutidos y a los resultados obtenidos en el presente, podemos decir que el tamaño de la fracción proteica influye sobre su capacidad antioxidante. Las diferencias que pudieran existir entre diferentes estudios pueden atribuirse al sistema donde se evalúa la actividad antioxidante y la fuente utilizada para obtener las fracciones proteicas.

Reducción de Radicales Libres

La capacidad que tienen algunas proteínas o compuestos de origen proteico para reducir la oxidación lipídica, se ha relacionado con su habilidad para atrapar radicales libres (Chan y cols., 1994; O'Neill y cols., 1998; Wu y cols., 2003). La capacidad para atrapar radicales libres de las distintas fracciones proteicas, el hidrolizado y la proteína intacta (APS), se muestran en la Tabla 6.

La ultrafiltración de FH pudo separar fracciones con una habilidad de estabilizar radicales libres, significativamente mayor, la cual fue incrementándose a medida que el tamaño de las fracciones era menor ($p < 0.05$). De todas las muestras obtenidas a partir de FH, la fracción F4 fue la más efectiva ya que mostró la capacidad para reducir en un 21.26% la concentración de radicales libres.

Todas las fracciones obtenidas por ultrafiltración de QH fueron más efectivas que el propio hidrolizado para atrapar radicales ($p < 0.05$), de estas, la más eficaz fue Q4, con un 24.35%. Excepto por Q1, al igual que en las muestras obtenidas a partir FH, también se observó una tendencia a aumentar actividad anti-radical con respecto al peso molecular de las fracciones.

Al comparar por tipo de enzima la actividad anti-radical de las fracciones 1, 2, y 3, se aprecian variaciones similares a las observadas en la capacidad antioxidante en el sistema de liposomas. En la sección de resultados de actividad antioxidante en el sistema de liposomas se explican las principales diferencias entre estas fracciones que pudieran estar afectando de igual manera en este caso, su capacidad para atrapar radicales libres.

Tabla 6. Capacidad para atrapar radicales libres del APS, los hidrolizados y las distintas fracciones proteicas obtenidas por ultrafiltración^{1,2,3}.

| Fracción | Actividad anti-radical (%) |
|----------|----------------------------|
| APS | 9.00±0.16 ^{fg} |
| FH | 4.97±0.77 ^h |
| F1 | 9.23±0.98 ^{fg} |
| F2 | 12.29±0.16 ^{de} |
| F3 | 16.98±0.61 ^c |
| F4 | 21.26±0.57 ^b |
| QH | 7.43±1.10 ^g |
| Q1 | 16.23±0.21 ^c |
| Q2 | 10.29±0.47 ^{ef} |
| Q3 | 13.38±1.87 ^d |
| Q4 | 24.35±0.41 ^a |

1. Fracciones obtenidas con Flavourzyme^R: FH: Hidrolizado sin ultrafiltrar, F1: Remanente de la membrana de 50 kDa, F2: Permeado de la membrana de 50 kDa, F3: Permeado de la membrana de 10 kDa, F4: Permeado de la membrana de 3 kDa; Fracciones obtenidas con quimiotripsina: QH: Hidrolizado sin ultrafiltrar, Q1: Remanente de la membrana de 50 kDa, Q2: Permeado de la membrana de 50 kDa, Q3: Permeado de la membrana de 10 kDa, Q4: Permeado de la membrana de 3 kDa

2. Media y desviación estándar de tres replicas

3. Valores con distinto superíndice, son significativamente diferentes (p<0.05)

Análisis Multivariado

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar el efecto de las características (composición de aminoácidos, solubilidad e hidrofobicidad) de las diferentes fracciones sobre la actividad antioxidante observada. Debido a la multidimensionalidad de las relaciones, provocada por la gran cantidad de variables, sus efectos sobre la actividad antioxidante se analizaron por métodos multivariados.

El análisis multivariado es una rama de la estadística que se encarga de analizar mediciones múltiples que se han hecho sobre una o varias muestras o bien, individuos. Este tipo de análisis posee la propiedad de poder enfrentar a diferentes variables o factores independientes, juntas, (asociadas o no, a covariables) con una o más variables dependientes. Existen varios tipos de análisis multivariados, entre los más utilizados se encuentran la correlación múltiple, regresión lineal múltiple, análisis discriminante, análisis de componente principal, regresión logística, entre otros (Cooley y Lohnes, 1971). Estos métodos han sido utilizados en estudios para determinar cuantitativamente la relación entre las características y la funcionalidad de ciertas proteínas (Peña-Ramos y cols., 2004; Arteaga y Nakai, 1993).

Análisis de Correlación

Se llevó a cabo un análisis de correlación lineal entre las características individuales de las fracciones proteicas y su capacidad para inhibir la oxidación en el sistema modelo de liposomas y el de radicales libres (Tabla 7).

Para el caso de la actividad antioxidante medida en el sistema de liposomas, las variables que presentaron correlaciones significativas ($p < 0.05$), fueron: solubilidad (0.36), y los aminoácidos fenilalanina (0.81), leucina (0.52),

Tabla 7. Coeficiente de correlación (r) entre la solubilidad, hidrofobicidad y aminoácidos y la actividad antioxidante en un sistema modelo de liposomas y uno de radicales libres.

| Variable | Actividad Antioxidante (Sistema Liposomal)* | Actividad Anti-radical (Medida con DPPH)* |
|----------------|---|---|
| Solubilidad | 0.36* | 0.39* |
| Hidrofobicidad | -0.35 | -0.43* |
| Asp | -0.30 | -0.36* |
| Glu | -0.42 | -0.31 |
| Ser | 0.45 | 0.38* |
| Hls | -0.45* | -0.42* |
| Gly | -0.34 | -0.09 |
| Thr | 0.12 | 0.16 |
| Arg | 0.41* | 0.33 |
| Ala | 0.25 | 0.22 |
| Tyr | 0.38* | 0.40* |
| Met | -0.30 | -0.33 |
| Val | -0.09 | -0.13 |
| Phe | 0.81* | 0.67* |
| Ile | -0.13 | -0.21 |
| Leu | 0.52* | 0.32 |
| Lys | -0.57* | -0.74* |
| Cys | -0.53* | -0.36 |

*Coeficientes de correlación significativos ($p < 0.05$)

arginina (0.41), tirosina (0.38), lisina (-0.57), cisteína (-0.52) e histidina (-0.45). Los valores positivos nos indican que a mayor concentración del aminoácido, mayor la actividad antioxidante y viceversa para las correlaciones negativas.

Debido a que los liposomas se encuentran en un sistema acuoso, una alta solubilidad de las fracciones les permitirá incorporarse mejor y proteger al lípido de la oxidación. Lo anterior explica el hecho de que la solubilidad haya correlacionado significativa y positivamente con la capacidad antioxidante en este sistema.

Por otro lado, se ha demostrado la actividad antioxidante de algunos aminoácidos como la fenilalanina (Decker y cols., 2000). También se han aislado péptidos con poder antioxidante, en los cuales se ha comprobado la importancia de tener en su secuencia aminoácidos hidrofóbicos como la leucina (Chen y cols., 1995). Además, la presencia de estos aminoácidos de carácter hidrofóbico en las fracciones proteicas, les puede ayudar a interaccionar con la fase lipídica del sistema, mejorando su efectividad como antioxidantes.

En este sistema de medición de actividad antioxidante, la tirosina puede ejercer un efecto promotor de la capacidad de las fracciones proteicas para atrapar radicales libres. Este aminoácido ha sido propuesto como un potente donador de electrones, lo cual sugiere una gran capacidad para estabilizar radicales, atribuida al grupo hidroxilo presente en su estructura (Ostdal y cols., 1997). Al igual que la tirosina, la cisteína ha demostrado tener capacidad para donar electrones (Yanishlieva, 2001). Sin embargo, se sabe que la cisteína puede comportarse como pro-oxidante en presencia de iones metálicos (Kanner y cols., 1986). En este sistema modelo la oxidación fue catalizada por fierro, lo que explica que la correlación negativa ($p < 0.05$) de este aminoácido con la capacidad antioxidante.

Existen estudios donde se hace referencia a la importancia de la histidina en la actividad antioxidante de algunos péptidos (Yen y cols., 2002b; Wu y cols., 2003). En el presente trabajo la concentración de este aminoácido se

correlacionó de manera negativa ($p < 0.05$). Sin embargo, aunque no se encuentre en altas concentraciones en las fracciones más activas, tal vez por ser fracciones peptídicas pequeñas, la histidina presenta una mayor disponibilidad o "libertad" para actuar como antioxidante. En un estudio realizado por Chen y cols. (1996), se concluyó que la secuencia, más específicamente, la posición de la histidina afecta las características antioxidantes de algunos péptidos.

En cuanto a la actividad anti-radical, está se correlacionó ($p < 0.05$) con: solubilidad (0.39), hidrofobicidad (-0.43) y los aminoácidos: fenilalanina (0.67), tirosina (0.4), serina (0.38), lisina (-0.74), histidina (-0.42), ácido aspártico (-0.36). Según el análisis de correlación, la hidrofobicidad y la solubilidad tienen un efecto opuesto sobre la capacidad de las muestras proteicas para atrapar radicales libres ($p < 0.05$). Esto puede ser debido al sistema polar donde se está llevando a cabo este análisis, el cual permite que las fracciones más solubles se incorporen de mejor forma al sistema para atrapar radicales libres.

Aunque la fenilalanina tiene capacidad antioxidante (Decker y cols. 2000), no se ha establecido el mecanismo de acción. Por lo tanto, no se puede asegurar que su correlación positiva ($p < 0.05$) se deba a su capacidad para estabilizar radicales libres. Se ha reportado que la tirosina y serina tienen poder antioxidante (Marcuse, 1960; Kikugawa y cols., 1991; Ostdal y cols., 1997), aunque tan solo para la primera se ha determinado que el mecanismo de acción se basa en la estabilización de radicales. Sin embargo, posiblemente el grupo hidroxilo presente en la estructura de la serina, al igual que en la tirosina, le confiera capacidad para estabilizar radicales libres donando electrones.

Algunos estudios han demostrado que la histidina puede actuar como antioxidante gracias a su capacidad de donar electrones a radicales libres, sin embargo, para este sistema se correlacionó negativamente ($p < 0.05$). Es posible

que esta correlación negativa sea debido a las razones explicadas para la actividad antioxidante en el sistema de liposomas.

Regresión Lineal Múltiple

Se llevó a cabo este análisis para evaluar la relación lineal existente entre las características de las fracciones proteicas (solubilidad, hidrofobicidad y composición de aminoácidos) y su capacidad antioxidante tanto en el sistema de liposomas como en el de reducción de radicales libres. El tipo de regresión utilizada para generar la ecuación del modelo fue el de "todas las regresiones posibles".

El modelo encontrado para la variable dependiente (actividad antioxidante) en el sistema modelo de liposomas, fue el siguiente:

$$\text{Inhibición de TBARS (\%)} = 62.59 + 1.07[\text{Solubilidad}] + 1.52 \times 10^{-4}[\text{Hidrofobicidad}] - 41.35[\text{His}] - 35.79[\text{Ala}] + 13.97[\text{Tyr}] + 13.98[\text{Phe}].$$

Este modelo posee una R^2 (coeficiente de determinación) de 0.92, una R^2 ajustada de 0.90 y un error estándar (ES) de 7.60.

La ecuación de inhibición de TBARS involucra variables como la solubilidad e hidrofobicidad, las cuales son características importantes que influyen en la funcionalidad de compuestos proteicos. Como se discutió en el análisis de correlación, también tienen efecto sobre la actividad antioxidante de las fracciones proteicas evaluadas en el presente trabajo.

El modelo toma en cuenta algunos aminoácidos como la fenilalanina y la tirosina que se ha mencionado tienen propiedades antioxidantes por sí solos (Kikugawa y cols., 1991; Ostdal y cols., 1997; Decker y cols, 2000), o bien

efecto en algunos péptidos aislados con estas propiedades. Anteriormente, se discutió en el análisis de correlación, sobre posible efecto de estos aminoácidos en las propiedades antioxidantes de las fracciones peptídicas.

La regresión múltiple para la actividad anti-radical arrojó un modelo con una $R^2 = 0.90$, una R^2 ajustada=0.87, y un ES=2.08:

$$\text{Actividad Anti-radical} = -82.29748 + 0.88[\text{Glu}] + 8.64[\text{Thr}] + 9.89[\text{Phe}] + 3.46[\text{Ile}] - 6.47[\text{Leu}] + 11.76[\text{Cys}].$$

El modelo encontrado para la capacidad de atrapar radicales libres, toma en cuenta la cisteína. Este aminoácido ha mostrado en algunos estudios tener capacidad de estabilizar radicales libres mediante la donación de electrones (Yanishlieva, 2001). Cabe destacar la aparición en el modelo de los aminoácidos treonina, ácido glutámico, isoleucina y leucina, los cuales no presentaron una correlación significativa ($p > 0.05$) con la capacidad de las muestras para atrapar radicales libres.

El hecho de que algunas variables hayan correlacionado significativamente ($p < 0.05$) con cualquiera de las variables de respuesta evaluadas, no significa que necesariamente tengan que estar incluidas en el modelo de predicción. Lo anterior se debe a que en el modelo de predicción las variables independientes se evalúan en conjunto, y la ausencia o presencia de alguna(s) de ellas, podría estar afectando el peso de otra variable predictora para ser incluida en la ecuación.

Validación Cruzada

La validación cruzada se llevó a cabo para tener una idea del poder de predicción de los modelos obtenidos tanto para actividad antioxidante en el sistema de liposomas, como para la actividad anti-radical medida con DPPH.

En este trabajo el tipo de validación cruzada utilizado se denomina "sustituyendo un dato a la vez". Este análisis consiste en eliminar un dato de la variable de respuesta a la vez, y posteriormente calcular el residual con el valor predicho para el dato que está siendo evaluado. Esta operación se repite para todos los valores de la variable de respuesta y se obtiene el error estándar de estimación (EES) para el modelo. El EES es útil para establecer o decidir si el modelo encontrado con las variables originales tiene una capacidad de predicción confiable.

Las Figuras 7 y 8, corresponden a los valores reales *versus* los obtenidos en el análisis de validación cruzada, para ambos sistemas de evaluación de la actividad antioxidante. La línea de tendencia mostrada corresponde a una predicción ideal (datos reales *versus* datos reales), con la que se pueden analizar los errores individuales de los datos predichos con respecto a los experimentales.

Los puntos graficados de los valores predichos para la actividad antioxidante (Fig. 7) se distribuyen en forma lineal y homogénea alrededor de la línea de predicción ideal. Además, no se presentan valores anómalos o extremos que pudieran afectar la fiabilidad del modelo encontrado.

La R^2 obtenida para los datos de la validación cruzada fue de 0.89, la cual es muy aceptable al compararla con el valor de 0.92, obtenida en el análisis de regresión original.

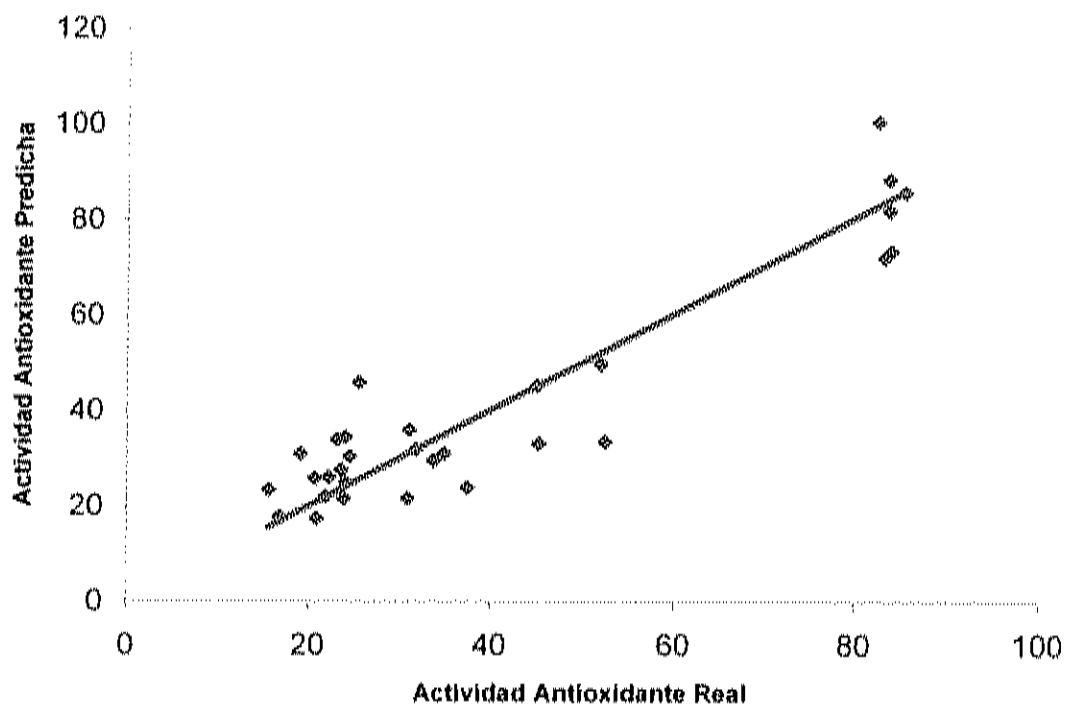


Fig. 7. Gráfica de dispersión de los valores de actividad antioxidante real y la actividad antioxidante predicha con la validación cruzada.

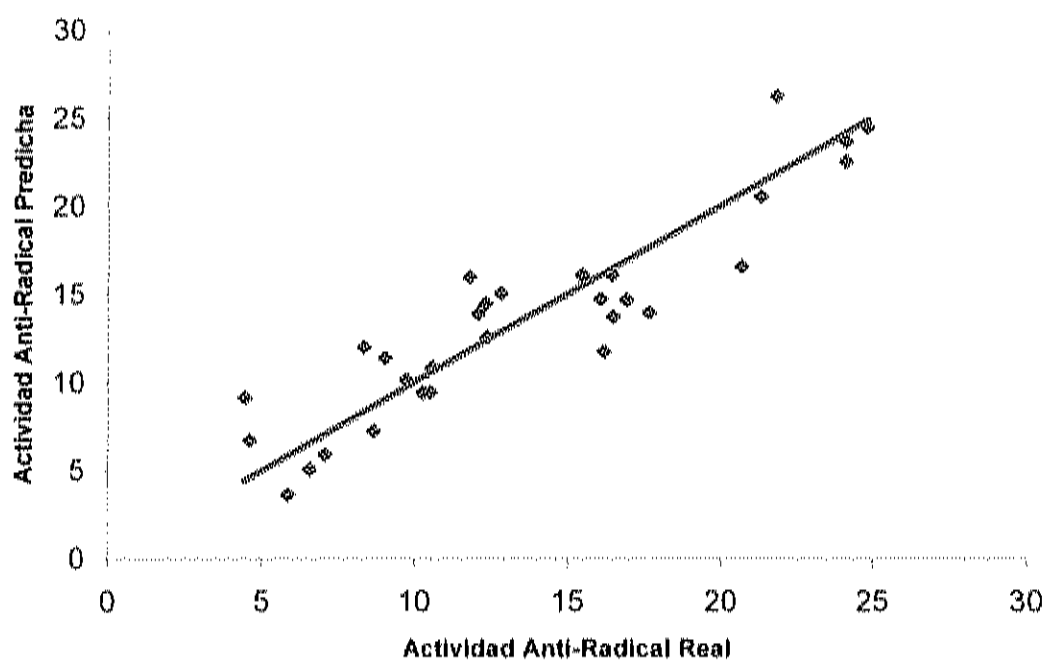


Fig. 8. Gráfica de dispersión de los valores de actividad anti-radical real y la actividad anti-radical predicha con la validación cruzada.

Con respecto a los valores graficados que corresponden a la capacidad para atrapar radicales libres, y que fueron predichos en el análisis de validación, tampoco se observan valores extremos. Incluso, la dispersión de los datos alrededor de la línea de tendencia trazada, son un poco más homogéneos que los observados para la actividad antioxidante en el sistema de liposomas (Fig. 8). La R^2 de 0.80, obtenida para los datos de validación correspondientes a la actividad anti-radical, se disminuyó con respecto al valor de 0.90, determinado para la regresión lineal de los datos experimentales. Sin embargo a pesar de la disminución, sigue siendo un valor aceptable.

El EES obtenido para los modelos evaluados es de 9.97 y 2.70, para el de actividad antioxidante en el sistema de liposomas y el de radicales libres, respectivamente. Al comparar estos valores con los de ES's obtenidos en el análisis de regresión múltiple, se puede observar que son muy similares para ambos modelos, lo que indica un buen poder de predicción.

Por otro lado, existe un criterio para validar modelos llamado "valor de contracción", que se basa en la diferencia entre las R^2 's, la cual no debe ser mayor a 0.1 (Kleimbaum y cols., 1982). De acuerdo a los valores de R^2 obtenidos de los datos de validación y de la regresión múltiple, este criterio se cumple para ambos modelos.

CONCLUSIONES

El proceso de hidrólisis del APS y la ultrafiltración de los hidrolizados, fueron efectivos para separar péptidos o fracciones peptídicas con una actividad antioxidante alta. Específicamente las fracciones F4 y Q4, fueron las más efectivas para evitar la oxidación de liposomas catalizada por iones fierro y para atrapar radicales libres (DPPH).

La solubilidad e hidrofobicidad mostraron tener efecto en la capacidad de las fracciones peptídicas para inhibir la oxidación lipídica en el sistema modelo de liposomas. Las fracciones más efectivas mostraron ser totalmente solubles, además de presentar valores de hidrofobicidad relativamente bajos, sin embargo, esta última no se correlacionó significativamente con su actividad antioxidante. En lo que respecta a la actividad anti-radical, en este caso si se afectó de manera significativa, por ambas características, obteniendo las fracciones más activas con una alta solubilidad y una hidrofobicidad baja.

Destacan en las fracciones más efectivas para inhibir la oxidación lipídica y atrapar radicales libres la abundancia de algunos aminoácidos como la fenilalanina, tirosina y leucina y cisteína. La presencia de estos aminoácidos afecta la capacidad antioxidante de las fracciones, ya sea que se encuentren dentro de la secuencia de algunos péptidos, o bien en forma libre.

Por otro lado, mediante el análisis de regresión se obtuvieron modelos con una buena capacidad de predicción. Estos modelos pueden ser útiles para predecir la actividad antioxidante de péptidos con determinadas características, en los sistemas evaluados. Además, a diferencia de la correlación con los modelos podemos tener una idea más clara de cuales variables independientes, analizadas ya en conjunto, son las que influyen más o tienen más peso sobre la variable de respuesta.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la capacidad de las fracciones peptídicas producidas para inhibir la oxidación y atrapar radicales libres se ve afectada por la composición de aminoácidos, solubilidad, hidrofobicidad y el tamaño de dichas fracciones. Sin embargo, hay que mencionar que también la secuencia aminoácida puede estar afectando sus propiedades antioxidantes.

Se recomienda, evaluar las fracciones peptídicas que mostraron mejores resultados directamente en un sistema alimenticio susceptible a oxidación, por ejemplo en productos cárnicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adegoke, G.O.; Kumar, M.V.; Krishna, A.G.; Varadaraj, M.C.; Sambajah, K.; Lokesh, B.R. 1998. Antioxidants and lipid oxidation in foods. *J. Food Sci. Tech.* 4:283-298.
- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzensulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* 27:1256-1262.
- Adler-Nissen, J.; Olsen, H.S. 1979. The influence of peptide chain length of taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. *Functionality and Protein Structure*. p. 125-142, Pour-El, American Chemical Society.
- Adler-Nissen, J. 1986. *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, New York.
- Adler-Nissen, J. 1993. Proteases. En *Enzymes in Food Processing*, p. 159-203, 3^{ra} edición, Academic Press, Inc., San Diego.
- Ahn, H.J.; Kim, J.H.; Jo, C.; Kim, M.J.; Byun, M.W. 2004. Comparison of irradiated phytic acid and other antioxidants for antioxidant activity. *Food Chem.* 88:173-178.
- Amarowicz, R.; Shahidi, F. 1997. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. *Food Chem.* 58:355-359.
- Anderson, R.L. and Davis, S. 1982. An organic phosphorus assay which avoids the use of hazardous perchloric acid. *Clin. Chim. Acta.* 121:111.
- Arteaga, G.; Nakai, S. 1993. Predicting protein functionality with artificial neural networks: Foaming and emulsifying properties. *J. Food Sci.* 58:1152-1156.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. *Official methods of analysis*. Kenneth Helrich (Ed.). 5^a edición. Vol. 1.
- Baran, E.J. 2000. Metal complexes of carnosine. *Biochem. (Moscow)*. 65:928-937.
- Barretto, A.C.S.; Idab, E.I.; Silvab, R.S.F.; Torresc, E.A.F.S.; Shimokomakib, M. 2003. Empirical models for describing poultry meat lipid oxidation inhibition by natural antioxidants. *J. Food Compos. Anal.* 16:587-594.

- Bersuder, P.; Hole, M.; Smith, G. 1998. Antioxidants from a heated histidine-glucose model system. I: Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high-performance liquid chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75:181-187.
- Bishov, S.J.; Henick, A.S. 1972. Antioxidant effect of protein hydrolysates in a freeze-dried model system. *J. Food Sci.* 37:873-875.
- Browdy, A.A.; Harris, N.D. 1997. Whey improves oxidative stability of soybean oil. *J. Food Sci.* 62:348-350, 376.
- Calderón de la Barca A.M.; Ruiz-Salazar, R.A.; Jara-Marini M.E. 2000. Enzymatic hydrolysis and sintesis of protein to improve its aminoacid composition and functional properties. *J. Food Sci.* 65:246-253.
- Chan, W.K.M.; Decker, E.A.; Lee, J.B.; Butterfield, D.A. 1994. EPR spin-trapping studies of the hydroxyl radical scavenging activity of carnosine and related dipeptides. *J. Agric. Food Chem.* 42:1407-1410.
- Chen, H.M.; Muramoto, K.; Yamauchi, F. 1995. Structural analisys of antioxidant peptides from soybean conglycinin. *J. Agric. Food Chem.* 43:574-578.
- Chen, H.M.; Muramoto, K.; Yamauchi, F.; Nokihara, K. 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidant peptide isolated from digests of soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* 44:2619-2623.
- Chen, H.M.; Muramoto, K.; Yamauchi, F.; Fujimoto, K.; Nokihara, K. 1998. Antioxidants properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digest of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* 46:49-53.
- Cheryan, M. 1998. Ultrafiltration and microfiltration handbook. Technomic Publishing Company, Inc. Lancaster, Penssylvania, USA. 374 p.
- Chiang, W.D.; Shih, C.J.; Chu, Y.H. 1999. Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. *Food Chem.* 65:189-194.
- Chobert, J.M.; Bertrand-Harb, C.; Nicolas, M.G., 1988. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *J. Agric. Food Chem.* 36:883-892.
- Clemente, A. 2000. Enzymatic protein hydrolysis in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* 11:254-262.

- Colbert, L.B.; Decker, E.A. 1991. Antioxidant activity of an ultrafiltration permeate from acid whey. *J. Food Sci.* 56:1248-1250.
- Cooley, W.W; Lohnes, P.R. 1971. *Multivariate Data Analysis*. John Wiley and Sons, Inc. New York, N.Y.
- Coppen, P.P. 1999. The use of antioxidants. En *Rancidity in Foods*, J.C. Allen and R.J. Hamilton (Eds.), p. 84-103, 3^{ra} edición, An Aspen Publication, Great Britain.
- Decker, E.A.; Crum, A.D.; Calvert, J.T. 1992. Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron. *J. Agric. Food Chem.* 40: 756.
- Decker, E.A.; Hultin, H.O. 1990. Factors influencing the catalysis of lipid oxidation by the soluble fraction of mackerel ordinary muscle. *J. Food Sci.* 55:947-950.
- Decker, E.A.; Livisay, S.A.; Zhou, S. 2000. Mechanisms of endogenous skeletal muscle antioxidants: Chemical and physical aspects. En *Antioxidants in muscle foods*, E.A. Decker, C. Faustman, C.J. Lopez-Bote (Eds.), p. 25-60, Editorial Wiley Interscience, New York, NY.
- Deeslie, W.D.; Cheryan, M. 1991. Functional properties of soy protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *J. Food Sci.* 57:411-413.
- Elliott J.G. 1999. Application of antioxidant vitamins in food and beverages. *Food Technol.* 53:43-48.
- Frankel, E.N.; Huang, S.W.; Aeschbach, R.; Prior, E. 1996. Antioxidant activity of rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 44:131-135.
- Frankel, E.N.; Huang, S.W.; Kanner, J.; German, J.B. 1994. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants : bulk oils vs emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1054-1059.
- Fukumoto, L.R.; Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food. Chem.* 48:3597-3604.
- Graf, E.; Empson, K.L.; Eaton, J.W. 1987. Phyllic Acid: A natural antioxidant. *J. Biol. Chem.* 262(24):11647-11650.

- Gray, J.I.; Gomma, E.A.; Buckley, D.J. 1996. Oxidative quality and shelf life of meals: A review. *Meat Sci.* 43:111-123.
- Gregory III, J.F. 1996. Vitamins. En *Food Chemistry*, O.R. Fennema (Ed.), p. 531-616, Editorial Marcel Dekker, Inc., 3^{ra} edición, New York.
- Gordon, M.C. 2001. The development of oxidative rancidity in foods. *Antioxidants in Food*, J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon (Eds.), p. 7-21, Woodhead Publishing Limited, 1^{ra} edición. Cambridge, England.
- Guadix, A.; Guadix, E.M.; Paez-Dueñas, M.P.; González-Tello, P.; Camacho, F. 2000. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars. Pharmaceutica.* 41:79-89.
- Hamilton, R.J. 1999. The chemistry of rancidity in foods. En *Rancidity in Foods*, J.C. Allen and R.J. Hamilton (Eds.), p. 1-21, 3^{ra} edición, An Aspen Publication. Great Britain.
- Hattori, M.; Yamaji-Tsukamoto, K.; Kumagai, H.; Feng, Y.; Takahashi, K. 1998. Antioxidative activity of soluble elastin peptides. *J. Agric. Food Chem.* 46:2167-2170.
- Hettiarachchy, N.; Kalapathy, U. 1997. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. *J. Food Sci.* 62:1110-1115.
- Hirose, A.; Miyashita, K. 1999. Inhibitory effect of proteins and their hydrolysates on the oxidation of triacylglycerols containing docosahexaenoic acids in emulsion. *J. Jap. Soc. Food, Sci. Technol.* 46:799-805.
- Huang, S.W.; Frankel, E.N.; German, J.B. 1997. Effects of individual tocopherols and tocopherol mixtures on the oxidative stability of corn oil triacylglycerols. *J. Agric. Food Chem.* 43:2345-2350.
- Ito, N.; Hirose, M.; Fukushima, H.; Isuda, T.; Shirai, T.; Tatematsu, M. 1986. Studies on antioxidants and their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogens. *Food Chem. Toxicology.* 24:1071-1082
- Jeon, Y.J.; Byun, H.G.; Kim, S.K. 1999. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochem.* 35:471-478.
- Jun, S.Y.; Park, P.J.; Jung, W.K. 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *Eur. Food Res. Technol.* 219:20-26.

- Kahl, J.L.; Artz, W.E.; Schanus, E.G. 1988. Effects of relative humidity on lipid autoxidation in a model system. *Lipids*. 23:275-279.
- Kanner, J.; Harel, S; Hazan, B. 1986. Muscle membranal lipid oxidation by iron redox cycle system: Initiation by oxy radicals and site-specific mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 34:506-510.
- Karel, M.; Schaich, K.; Roy, R.B. 1975. Interaction of peroxidizing methyl linoleate with some proteins and aminoacids. *J. Agric. Food Chem.* 23:159-163.
- Karpinska, M.; Borowski, J.; Danowska-Oziewicz, M. 2001. The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. *Food Chem.* 72:5-9.
- Kato, A., Nakai, S., 1984. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* 624: 13-20.
- Kawakami, Y.; Tsurugasaki, W.; Yoshida, Y.; Igarashi, Y.; Nakamura, S.; Osada, K. Regulative actions of dietary soy isoflavone on biological antioxidative system and lipid metabolism in rats. *J. Agric. Food Chem.* 52:1764-8.
- Kikugawa, K; Kato, T.; Hayasaka, A. 1991. Formation of dityrosine and other fluorescent amino acids by reaction of amino acids with lipids hydroperoxides. *Lipids*. 26:922-929.
- Kim, S.K.; Kim, Y.T.; Byun, H.K.; Nam, K.S.; Joo, D.S.; Shahidi, F. 2001. Isolation and characterization of antioxidant peptides from gelatin hydrolysate of Allaska Pollack skin. *J. Agric. Food Chem.* 49:1984-1989.
- Kleimbaum, D; Kuppe, L; Muller, K. 1982. *Applied regression analysis and other multivariable methods*. 3^{ra} edición. Brooks/Cole Publishing Company.
- Klump, S.P.; Allred, M.C.; MacDonald, J.L.; Ballam, J.M. 2001. Determination of isoflavones in soy and selected foods containing soy by extraction, saponification, and liquid chromatography. *J. of AOAC Int.* 84(6):1865-1883.
- Lahl, W.J.; Braun, D.S. 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.* 48:68-71.
- Ladikos, D.; Lougovois, V. 1990. Lipid oxidation in muscle foods: A review. *Food Chem.* 35:295-314.

- Lee, J.; Renita, M.; Floritto, R.J.; St. Martin, S.K.; Schwartz, S.J.; Vodovotz, Y. Isoflavone characterization and antioxidant activity of ohio soybeans. *J. Agric. Food Chem.* 52:2647-51.
- Lindsay, R.C. 1996. Food Additives. En *Food Chemistry*, O.R. Fenemma (Ed.), p. 767-823, Editorial Marcel Dekker, Inc. 3^{ra} edición, New York.
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Mahmoud, M.I. 1994. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technol.* 48:89-95.
- Marshall, N.E. 1974. Health foods, organic foods, natural foods. *Food Technol.* 28:50.
- Marcuse, R. 1960. Antioxidative effect of amino acids. *Nature.* 186:886-887.
- McCarthy, T.L.; Kerry, J.P.; Kerry, J.F.; Lynch, P.B.; Buckley, D.J. 2001a. Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. *Meat Sci.* 57:45-52.
- McCarthy, T.L.; Kerry, J.P.; Kerry, J.F.; Lynch, P.B.; Buckley, D.J. 2001b. Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Sci.* 57:177-184.
- McDonald R.E., Hultin, H.O. 1987. Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system in the microsomal fraction flounder skeletal muscle. *J. Food Sci.* 52:15-21, 27.
- Miková, K. 2001. The regulation of antioxidants in food. En *Antioxidants in Food*, J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon, p. 22-70, Woodhead Publishing Limited., 1era edición.
- Monahan, F.J. 2000. Oxidation of lipids in muscle foods: fundamental and applied concerns. En *Antioxidants in muscle foods*, E.A. Decker, C. Faustman, C.J. Lopez-Bote (Eds.) p. 3-24, Editorial Wiley Interscience, New York, NY.
- Murcia, M.A.; Egea, I.; Romojaro, F.; Parras, P.; Jimenez, A.M.; Martinez-Tome, M. 2004. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. *J. Agric. Food Chem.* 52:1872-1881.

- Nawar, W.W. 1996. Lipids. En *Food Chemistry*, O.R. Fenemma (Ed.), p. 225-319, Editorial Marcel Dekker, Inc., 3^{ra} edición. New York.
- Novo-Nordisk, 1995. *Short Introduction to Proteins and Protein Hydrolysis*. K. Pommer, BFA Protein, NOVO NORDISK A/S, Bagsvaerd, Denmark.
- Ostdal, H.; Skibsted, L.H.; Andersen, H.J. 1997. Formation of long-lived protein radicals in the reaction between H₂O₂-activated metmyoglobin and others proteins. *Free Rad. Biol. Med.* 23:754-761.
- O'Neill, L.M.; Galvin, K.; Morrissey, P.A.; Buckley, D.J. 1998. Inhibition of lipid oxidation in chicken by carnosine and dietary α -tocopherol supplementation and its determination by derivative spectrophotometry. *Meat Sci.* 50:479-488.
- O'Sullivan, C.M.; Lynch, A.M.; Lynch, P.B.; Buckley, D.J.; Kerry, J.P. 2004. Assessment of the Antioxidant Potential of Food Ingredients in Fresh, Previously Frozen and Cooked Chicken Patties. *Int. J. Poult. Sci.* 2:324-334.
- Peña-Ramos, E.A.; Xiong, Y. L. 2001. Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system. *J. Dairy Sci.* 84:2577-2583.
- Peña-Ramos, E.A.; Xiong, Y. L. 2002. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. *J. Food Sci.* 67:2952-2957.
- Peña-Ramos, E.A.; Xiong, Y. L.; Arteaga, G.E. 2004. Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *J. Sci. Food Agric.* (in press).
- Porter, W.L.; Black, E.D.; Drolet, A.M. 1989. Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipids emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems. *J. Agric. Food Chem.* 37:615-624.
- Rajalakshmi, D.; Narasimhan, S. 1996. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. En *Food Antioxidants*, D.L. Madhavi, S.S. Deshpande, and D.K. Salunkhe (Ed.), p. 65-157, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Ranalli, A.; Lucera, L.; Contento, S. 2003. Antioxidizing potency of phenol compounds in olive oil mill wastewater. *J. Agric. Food Chem.* 51:7636-7641.
- Sahoo, J.; Verma, S.P. 1999. Oxidative problems in meat and meat products and use of antioxidant vitamins. *J. Food Sci. Technol.* 36:487-499.

- Saeed, M.; Cheryan, M. 1988. Sunflower protein concentrates and isolates low in polyphols and phytate. *J. Food Sci.* 53: 1127-.
- Schägger, H.; Von-Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecylsulfates-poliacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins of the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
- Sherwin, E.R.; Thompson, J.W. 1967. Tertiary-butylhydroquinone: An antioxidant for fats and oils and fat-containing foods. *Food Technol.* 21:912-916.
- Silvestre, M.P.C. 1997. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chem.* 60:263-271.
- Stryer, L. 1988. Mechanisms of enzyme action. En: *Biochemistry*. Ed. Freeman. 3^{ra} edición. 220-221.
- Takahasi, O. 1992. Haemorrhagies due to defective blood coagulation do not occur in mice and guinea pigs fed butylated hydroxytoluene but nephrotoxicity is found to mice. *Food Chem. Toxicology.* 30:89-97.
- Tong, L.M.; Sasaki, S.; McClements, D. J.; Decker, E.A. 2000. Antioxidant activity of whey in a salmon oil emulsion. *J. Food Sci.* 65:1325-1329.
- Turgeon, S.L.; Gauthier, S.F.; Paquin, P. 1992. Emulsifying property of whey peptide fractions as a function of pH and ionic strength. *J. Food Sci.* 57:601-604.
- Umagat, H.; Kucera, P.; Wen, L.F. 1982. Total aminoacids analysis using pre-column fluorescence derivatization. *J. Chromatogr.* 239:163-174.
- Van-Esch, G.J. 1986. Toxicology of tertiary butylhydroquinone (TBHQ). *Food Chem. Toxicol.* 24: 1063-1065.
- Vázquez-Ortiz, F.A.; Caire, G.; Higuera, I.; Hernández, G. 1995. High performance liquid chromatographic determination of free amino acids in shrimp. *J. Liquid Chromatogr.* 18: 2059-2068.
- Villanueva, A.; Vioque, J.; Sánchez-Vioque, R.; Clemente, A.; Pedroche, J.; Bautista, J.; Millán, F. 1999. Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76:1455-1460.
- Wang, H.J.; Murphy, P.A. 1994. Isoflavone content in comercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* 42:1666-1673.

- Wuang, S.H; Frankel, E.N.; German, J.B.; Aeschbach, R. 1997. Partition of selected antioxidants in corn oil-water model systems. *J. Agric. Food Chem.* 45:1991-1994.
- Wu, S.U.; Brewer, M.S. 1994. Soy protein isolate antioxidant effect on lipid peroxidation of ground beef and microsomal lipids. *J. Food Sci.* 59:702-706,738.
- Wu, H.C.; Shiau, C.Y.; Chen, H.M.; Chiou, T.K. 2003. Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination. *J. Food Drug Anal.* 11:148-153.
- Wu, W.U.; Hettiarachchy, N.S.; Qi, M. 1998. Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of soy protein peptides prepared by papain modification and ultrafiltration. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75:845-850.
- Yanishlieva, N. 2001. Inhibiting oxidation. *Antioxidants in Food*, J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon, p. 22-70, Woodhead Publishing Limited., 1^{era} edición.
- Yee, J.J.; Shipe, F.; Kinsella, J.E. 1980. Antioxidant effects of soy protein hydrolysates on copper-catalyzed methyl linoleate oxidation. *J. Food Sci.* 45:1082-1083.
- Yen, G.C.; Chen, H.Y.; Lee, C.E. 1999. Measurement of antioxidative activity in metal ion-induced lipid peroxidation systems. *J. Agric. Food Chem.* 79:1213-1217. *J. Food Sci.* 45:1082-1083.
- Yen, G.C.; Duh, P.D.; Tsai, H.L. 2002a. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem.* 79:307-313.
- Yen, W.J.; Chang, L.W.; Lee, C.P.; Duh, P.D. 2002b. Inhibition of lipid peroxidation and nonlipid oxidative damage by carnosine. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79: 329-333.
- Zhou, S; Decker, E.A. 1999. Ability of aminoacids, dipeptides, polyamines, and sulfhydryls to quench hexanal, a saturated aldehydic lipid oxidation product. *J. Agric. Food Chem.* 47:1932-1936.