

## EFFECTO DE LA FERMENTACIÓN Y LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA EN LA GENERACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DE HARINA DE ARVEJA AMARILLA (*PISUM SATIVUM*)

### EFFECT OF FERMENTATION AND SIMULATED GASTROINTESTINAL DIGESTION ON THE GENERATION OF ANTIOXIDANT PEPTIDES FROM YELLOW PEA FLOUR (*PISUM SATIVUM*)

Cipollone, M A<sup>1</sup>, Tironi, V A<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA)-(CCT La Plata-CONICET, CICPBA, UNLP) - 47 y 116(1900) La Plata - Argentina maguscipollone@hotmail.com; vtironi@quimica.unlp.edu.ar

\*Correspondencia: vtironi@quimica.unlp.edu.ar

#### Resumen

Las arvejas (*Pisum sativum*) son legumbres de amplio consumo a nivel mundial. Sin embargo, la bioactividad de sus péptidos no ha sido lo suficientemente estudiada hasta el momento. En el presente trabajo se analizó harina de arvejas amarillas luego de ser sometida a dos procesos: simulación de la digestión gastrointestinal y fermentación. Se midió el grado de proteólisis, se analizó su composición peptídica mediante electroforesis (SDS-PAGE y Tricina SDS-PAGE) y cromatografía FPLC de filtración en gel, y se ensayaron dos métodos para evaluar la actividad antioxidante (métodos ORAC y HORAC). Luego de la digestión gastrointestinal, el grado de proteólisis obtenido fue  $29 \pm 2$  % y se pudo observar disminución de moléculas con masas moleculares mayores a 10 kDa con la consecuente aparición de moléculas de menores masas. Se evidenció un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de la actividad por el método de ORAC, sin encontrar diferencias en el caso de la actividad HORAC. En cuanto a la fermentación de la harina, la misma fue realizada por su propia microflora en dos condiciones de tiempo (24–48 h)/temperatura (30–37 °C). Los valores de grado de hidrólisis obtenidos (13-17 %) fueron menores a los obtenidos para la harina digerida. En cuanto a la composición polipeptídica, no se detectaron diferencias dadas por la fermentación excepto la posible formación de agregados. La actividad antioxidante (método de ORAC) presentó valores de IC50 para las condiciones 24h/30°C y 48h/37°C comparables con el obtenido para la harina digerida.

**Palabras claves:** arvejas amarillas, harina, simulación digestión gastrointestinal, harina fermentada, actividad antioxidante

#### Abstract

Peas (*Pisum sativum*) are legumes widely consumed worldwide. However, the bioactivity of its peptides has not been sufficiently studied so far. In this work, yellow pea flour was analyzed when subjected to two processes: simulation of gastrointestinal digestion and fermentation. Proteolysis degree, peptide/polypeptide composition (electrophoresis SDS-PAGE and Tricine SDS-PAGE, gel filtration chromatography), and two antioxidant activity assays (ORAC and HORAC methods) were performed. After gastrointestinal digestion, the degree of proteolysis was  $29 \pm 2$  % and a decrease in molecules with molecular weight greater than 10 kDa could be observed with the consequent appearance of smaller molecules. A significant increase in activity was evidenced by the ORAC method, without significant differences in HORAC activity. Regarding the fermentation of pea flour, it was carried out by its autochthonous microflora in two conditions of time (24–48 h)/temperature (30–37°C). The proteolysis degree values (13-17 %) were lower than those obtained for digested flour. Regarding the composition, no differences were detected due to fermentation except the possible formation of aggregates. The antioxidant activity (ORAC method) presented IC50 values for the 24 h/30°C and 48 h/37°C conditions comparable with those obtained for the digested flour.

**Keywords:** yellow peas, flour, gastrointestinal digestion, fermented flour, antioxidants properties

#### Introducción

Las legumbres -entre ellas las arvejas (*Pisum sativum*)- son de consumo habitual en la mayor parte del mundo, de forma directa o como ingredientes. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) propuso al año 2016 como el Año Internacional de las Legumbres Secas (<http://www.fao.org/pulses-2016/en/>) con el fin de potenciar estos cultivos por su rol en materia de seguridad alimentaria y nutricional y en la adaptación al cambio climático, la preservación de los suelos y la salud humana.

Las arvejas son una fuente importante de nutrientes y compuestos saludables (20-26% p/p de proteína, 1-3%

p/p lípidos, 46-50% p/p de carbohidratos y 14-18% p/p de fibra) aportando aproximadamente 317 kcal/100 g de grano (Zulet y Martínez, 2001). Estas semillas permiten la preparación de ingredientes diversos tales como harinas, aislados o concentrados proteicos, almidones y fibra, que son de importancia creciente en el diseño de alimentos saludables y para dietas especiales (Agboola, Mofolasayo, Watts y Aluko, 2010). Como aspecto negativo, las arvejas presentan componentes antinutricionales como  $\alpha$ -galactósidos, inhibidores de tripsina y fitatos, cuya concentración depende de la variedad y su eliminación es fundamental para mejorar la calidad nutricional.

Una de las opciones más adecuadas para incrementar el consumo de legumbres en la dieta diaria es utilizar sus harinas en las fórmulas de elaboración de productos horneados y mejorar sus características sensoriales y funcionales mediante la fermentación de masa madre (Gobbetti et al., 2019). Varios experimentos han demostrado que la fermentación de las legumbres mejora su valor nutritivo, reduce algunos compuestos endógenos antinutricionales como el ácido fítico y ejerce efectos beneficiosos sobre la digestibilidad de las proteínas y el valor biológico de las legumbres (Granito et al., 2002).

Diversos procesos, entre ellos las fermentaciones y la digestión gastrointestinal, pueden producir la liberación de péptidos con actividades biológicas. Existen algunos antecedentes de estudios de actividad antioxidante de péptidos de arvejas. Se ha informado que las fracciones más hidrofóbicas separadas a partir de un hidrolizado de arveja presentaron las mayores actividades de secuestro de radicales y de quelación de metales, aunque el carácter hidrofóbico no contribuyó al poder reductor (capacidad de donar electrones). También, se demostró que la propiedad catiónica de los aminoácidos afecta negativamente la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas (Pownall, Udenigwe y Aluko, 2010).

En Argentina, el cultivo de arveja se está consolidando debido a la creciente demanda para la exportación y porque es considerada cada vez más como una alternativa viable para incluir en la rotación, tanto por su rentabilidad como por los beneficios como antecesor de los cultivos de verano. En la última década, la producción de esta leguminosa se duplicó y la exportación aumentó casi 10 veces, siendo los principales destinos Brasil, España e India ([http://www.agroindustria.gov.ar/new/00/programas/dma/productos\\_no\\_tradicionales/Produccion%20Argentina%20de%20Legumbres%20-%202016.pdf](http://www.agroindustria.gov.ar/new/00/programas/dma/productos_no_tradicionales/Produccion%20Argentina%20de%20Legumbres%20-%202016.pdf)). Sin embargo, a pesar de este aumento en la demanda, las variedades nacionales han sido muy poco estudiadas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la potencialidad de harina de arvejas amarillas cultivadas en la provincia de Buenos Aires como fuente de péptidos antioxidantes generados mediante un proceso de fermentación autóctona y mediante un proceso de digestión gastrointestinal simulado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

1. Preparación y análisis de composición de la harina: Se utilizaron arvejas amarillas (*Pisum sativum* var. Yams) cultivadas en el año 2016 en el sur de la provincia de Buenos Aires. Para obtener la harina (H) se molieron las arvejas en molino Udy (malla 1mm). Se evaluó el contenido de humedad, cenizas y lípidos según los métodos de la AOAC (1990), carbohidratos mediante una hidrólisis ácida completa seguida del método colorimétrico de antrona (Southgate, 1976) y proteína por método de microKjeldhal seguido de la colorimetría modificada de Berthelot (Tabbaco, Meiattini, Moda y Tarli, 1979),  $f = 5.6$  g proteína/g N (Gueguen y Barbot, 1988).
2. Fermentación autóctona: Se prepararon harinas fermentadas (HF) por su propia flora a partir de dispersiones (36,4% p/p) de harina en agua destilada incubando a diferentes temperaturas (30°C o 37°C) por 24 y 48 h.
3. Simulación de la digestión gastrointestinal: Se obtuvo el digerido gastrointestinal simulado de la harina (HD) según el protocolo de Minekus et al. (2014) incluyendo las fases oral, gástrica e intestinal. Las muestras fueron mezcladas con fluido salival simulado (SSF, compuesto por KCl 0,5 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M, NaHCO<sub>3</sub> 1 M, MgCl<sub>2</sub> 0,15 M, y NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,61 M; pH = 7),  $\alpha$ -amilasa (Sigma 100-70 57,4 U/mg, 26 mg/ml en SSF, CaCl<sub>2</sub> 0,3 M) y se incubaron con agitación durante 2 min a 37°C. Luego, se agregó fluido gástrico simulado (SGF, compuesto por KCl 0,5 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M, NaHCO<sub>3</sub> 1 M, NaCl 2 M, MgCl<sub>2</sub> 0,15 M, y NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,61

M; pH = 3), pepsina (Sigma P7125  $\geq$  400 U/mg, 62,5 mg/ml en SGF) y CaCl<sub>2</sub> (0,3 M) y se incubó con agitación durante 2 h a 37°C. Por último, se agregó fluido intestinal simulado (SIF, compuesto por KCl 0,5 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M, NaHCO<sub>3</sub> 1 M, NaCl 2 M y MgCl<sub>2</sub> 0,15 M; pH = 7), pancreatina (MP Biomedicals inc.4X USP Grade, 15,3 mg/ml en SIF), bilis (150 mg/ml Bilis Fluka B3883), CaCl<sub>2</sub> (0,3 M) y se incubó con agitación durante 2 h a 37°C. Finalmente, se inactivaron las enzimas calentando 10 min a 85 °C y se liofilizó.

4. Grado de hidrólisis proteica (GH): fue determinado en las muestras de H, HF y HD mediante el método del TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico) (Adler-Nissen, 1979; Orsini Delgado, Tironi, & Añón, 2011).

5. Preparación de fracciones de polipéptidos/péptidos solubles: Muestras de H, HF y HD fueron solubilizadas en buffer fosfato salino (PBS, pH = 7,4, 500 rpm, 37°C, 1 h). La proteína soluble fue determinada en el sobrenadante mediante el método de Lowry (Lowry, Rosebrough, Farr y Randall, 1951).

6. Composición molecular: las muestra fueron analizadas mediante dos tipos de electroforesis, a- SDS-PAGE; las muestras se dispersaron (3 mg proteína/ml) en buffer muestra 1X (Tris 0,0625 M, SDS 2 %, glicerol 10 %v/v). Se utilizaron geles separadores de 12 % de poliacrilamida y geles de apilamiento con 4 % de poliacrilamida, sembrando 30  $\mu$ g de proteína, que fueron corridos a corriente constante (30 mA por placa, voltaje máximo 200 V). b- Tricina-SDS-PAGE (Schägger, 2006), las muestras se dispersaron (3 mg proteína/ml) en buffer muestra 1X (Tris-HCl 37,5 mM (pH = 7), glicerol 7,5 % p/v (Anedra), SDS 3 % p/v, Coomassie blue G 250 (Serva) 0,0125 % p/v). Se empleó un sistema de tres geles de diferente concentración: un gel de apilamiento, un gel espaciador y un gel separador (con urea 6 M) conteniendo 4, 10 y 16 % de acrilamida, respectivamente. Se sembraron 30  $\mu$ g de proteína. La corrida se realizó a voltaje constante, empezando con 30 mA durante el pasaje a través del gel stacking y aumentando a 100 mA hasta concluir. Finalizada la corrida, se procedió a tratar con solución fijadora (metanol 50 %, ácido acético 10 %, acetato de amonio 100 mM) durante 45 min. Para ambos tipos de electroforesis, se realizó la coloración con solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 manteniendo en agitación durante 2 h y una decoloración con solución decolorante (etanol 30 %, ácido acético 10 %) aplicado sucesivas veces Finalmente, se realizó una tinción con plata para aumentar la sensibilidad cuando fue necesario (Blum, Beier y Gross, 1987). Las electroforesis se realizaron en un equipo Mini Protean II (BIO-RAD).

También se realizaron corridas de cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC) de filtración en gel de las fracciones solubles en buffer PBS utilizando un equipo ÄKTA purifier (GE Healthcare) y dos columnas de exclusión molecular diferentes. La columna Superdex 75 10/300 GL (límite de exclusión: 102 kDa; rango de separación 3-70 kDa) (GE Healthcare) fue calibrada con azul dextrano (volumen de exclusión,  $V_0 = 7,3$  ml), albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (9,2 kDa), quimotripsina (25 kDa), ribonucleasa (19 kDa) y aprotinina (6,5 kDa) obteniéndose la siguiente ecuación para la curva de calibración:  $\log MM = 1,96 - 2,30 K_{av}$ , donde: MM: masa molecular,  $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$ ,  $V_e$  es el volumen de elución en mililitros del pico de interés;  $V_0$  es el volumen de exclusión y  $V_t$  es el volumen total de la columna ( $V_t = 24$  ml). Las muestras se filtraron con filtros de nylon de 0,45  $\mu$ m de poro. Se eluyeron 200  $\mu$ l de cada muestra con un flujo de 0,4 ml/min. Los polipéptidos y péptidos fueron detectados por absorbancia a 210 nm. La columna Superdex Peptide 10/300 GL (GE Healthcare) (límite de exclusión = 10000 Da; rango de separación = 100-7000 Da para proteínas globulares) fue calibrada con azul dextrano (volumen muerto,  $V_0 = 7,60$  ml), aprotinina (6500 Da), vitamina B12 (1855 Da) y ácido hipúrico (179,14 Da), obteniéndose la siguiente ecuación para la curva de calibración:  $\log MM = 4,84 - 3,30 K_{av}$ ,  $V_t = 24$  ml. Las muestras fueron filtradas con filtros de nylon de 0,45  $\mu$ m de poro. Las condiciones de corrida fueron: flujo 0,5 ml/min, volumen de muestra = 200  $\mu$ l, la detección fue realizada a 210 nm.

7. Determinación de la actividad antioxidante. La actividad antioxidante de las muestras solubles fue evaluada por dos métodos. El ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) consistió en mezclar 150  $\mu$ l de fluoresceína (53,3 nM) con 25  $\mu$ l de muestra, buffer (control negativo CN), o distintas diluciones del Trolox (6-hidroxy-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) (6,25 a 75  $\mu$ M) utilizado como referencia. Por último, se agregaron 250  $\mu$ l del AAPH (2,20-Azo-bis-(2-metilpropionamida) dihidrocloride) 160 mM y se realizaron lecturas de fluorescencia ( $\lambda_{exc}$ : 485 nm,  $\lambda_{em}$ : 535 nm) en un lector de microplacas (SYNERGY HT-SIAFRT, Biotek Instruments) cada 1 min hasta los 45 min, incubando a 37°C, con agitación continua. Para el ensayo HORAC (Hydroxyl Radical Averting Capacity) se preparó una solución de fluoresceína 0,0603

$\mu\text{M}$  en buffer PBS (pH = 7,4); una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,75 M en agua MilliQ y una solución de cobalto (10 mg de ácido picolínico, 11 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 50 ml de agua MilliQ). Las mezclas de reacción fueron preparadas añadiendo 190  $\mu\text{l}$  de la solución de fluoresceína; 20  $\mu\text{l}$  de muestra o buffer PBS (control negativo); 15  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 75  $\mu\text{l}$  de solución de cobalto. Se realizaron lecturas de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}}$ : 485 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 535 nm) en un lector de microplacas (SYNERGY HT-SIAFRT) cada 1 min hasta las 3 h, incubando a 37°C con agitación continua (Orsini Delgado, Galleano, Añón, y Tironi, 2015). Para ambos métodos, se graficó el % de inhibición de los radicales frente a la concentración de proteína de las muestras; cada punto de concentración se midió por duplicado. Las curvas se ajustaron mediante regresión lineal o regresión no lineal utilizando GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). La regresión no lineal se realizó de acuerdo a la ecuación dosis-respuesta sigmoidea (pendiente variable):  $Y = \text{bottom} + (\text{top} - \text{bottom}) / (1 + 10^{-(\text{Log IC}_{50} - X) \cdot \text{hillslope}})$ , donde  $X = \log(\text{concentración})$ ,  $Y = \%$  de inhibición de radicales. Para normalizar las curvas, “bottom” se restringió a un valor constante de 0 y “top” fue restringido a un valor constante de 100. Finalmente se obtuvo la concentración que inhibe el 50 % de los radicales ( $\text{IC}_{50}$ ).

8. Análisis estadístico. Se analizaron diferencias entre las muestras a través de un Análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores medios fueron evaluadas por el test de Tukey (GraphPad Prism 5.0, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La harina de arveja amarilla presentó un contenido de  $2,7 \pm 0,5 \%$  de cenizas y  $2,2 \pm 0,2 \%$  de grasa, valores comparables con los informados previamente para arvejas de origen canadiense (2,42 % de cenizas y 2,01 % de lípidos, Boye, Zare y Pletch, 2010). El valor obtenido para humedad fue  $10,4 \pm 0,1 \%$ . El valor nutritivo de las leguminosas se debe en parte a su aporte en carbohidratos, siendo el almidón el polisacárido mayoritario (Salunkhe y Kadam, 1989). En este caso, el valor obtenido (67,9 %) fue superior a los informados en bibliografía (46 % según USDA National Nutrient DataBa). Una posible explicación para este resultado podría ser que la hidrólisis ácida extensiva realizada podría haber atacado también componentes de la fibra, dado que la suma de carbohidratos más fibra informada en otros trabajos es comparable al valor total obtenido en el presente. Sin duda, el elevado contenido proteico en la mayoría de las especies de leguminosas convierte a esta familia en la principal fuente de proteína vegetal para el hombre (Cubero y Moreno, 1983). El contenido en las arvejas se sitúa entre el 20-26 % en base húmeda (b.h.). Los datos obtenidos en este trabajo mostraron un valor de  $18 \pm 1 \%$  en b.h. (20 % base seca (b.s.)). Boye, Zare y Pletch (2010) informaron un valor de 21 % de proteínas (24,6 % en base seca (b.s.)) en arvejas amarillas de Canadá.

La evaluación de propiedades bioactivas de componentes alimentarios requiere poder simular la liberación de dichos componentes durante la digestión gastrointestinal. En este sentido, se realizó una simulación in vitro de la digestión gastrointestinal de la harina. Se utilizó un ensayo estático basado en un protocolo generado en el marco de la Acción INFOGEST de la Unión Europea, el cual cuenta con consenso internacional (Minekus et al., 2014). Este método está basado en las condiciones fisiológicas e incluye una fase oral, una gástrica y una intestinal, cada una de ellas contiene soluciones de electrolitos completas cuya composición se detalla en la sección Materiales y Métodos. En primer instancia se midió el grado de hidrólisis (GH) que es uno de los indicadores más utilizados como un parámetro de monitoreo de la proteólisis (Adler-Nissen, 1979). El valor obtenido se muestra en la Tabla 1, el cual resultó ser un poco mayor al publicado por Barbana y Boye (2011) quienes trabajaron con suspensiones de concentrados de proteínas de lentejas (5 % p/p) y obtuvieron un GH (método de TNBS) de 29 % luego de la digestión gastrointestinal. Se determinó el contenido de proteína en los digeridos gastrointestinales liofilizados a través del método de microKjeldahl, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 1. Se evaluó la concentración de proteína soluble (por el método de Lowry) obtenida a partir de la dispersión de H o HD (10 mg de muestra/ml en buffer PBS). En la Tabla 1 se presentan estos resultados junto con los correspondientes % de solubilidad proteica (respecto a la proteína total). Puede observarse que no se registraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el % de solubilidad luego de la digestión. Estos resultados sugieren que la hidrólisis se produjo fundamentalmente sobre moléculas proteicas que eran solubles en las muestras de partida.

Por otra parte, se realizaron procesos de fermentación de la harina por su propia flora a dos temperaturas (30°C y 37°C) y durante dos tiempos (24 y 48 h). En la Tabla 2 se presentan los valores de pH alcanzados en las distintas condiciones. Se registró un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) de pH a ambos tiempos de fermentación. No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) dados por la temperatura de fermentación. Estos datos fueron comparables con los publicados por Torino et al. (2013) para lentejas fermentadas naturalmente donde los valores obtenidos para el tiempo inicial y las 48 h a 37°C fueron 6,63 y 3,67 respectivamente. También se estudió el nivel de proteólisis por el método de TNBS para el cual se obtuvieron, en todas las condiciones, valores entre 13 y 17 %, y se evidenció que la proteólisis no avanzó luego de las 24 h de fermentación. Estos valores son notablemente menores que el obtenido luego de la digestión gastrointestinal simulada (Tabla 1). La solubilidad proteica (proteína soluble en buffer PBS (método de Lowry)/100 g proteína total (método de microKjeldahl)) de todos los fermentos presentó valores similares ( $54 \pm 2$  %), mientras que para la muestra antes de la fermentación la solubilidad proteica fue de  $68 \pm 4$  % (Tabla 1). En este caso, se evidencia una disminución de la solubilidad en las HFs con respecto a HF0, lo cual podría estar relacionado con formación de agregados durante la incubación correspondiente al proceso de fermentación.

Se realizaron ensayos de electroforesis a fin de analizar la composición molecular de las diferentes muestras. La harina presentó una gran diversidad de polipéptidos en las corridas de SDS-PAGE. La mayoría de las bandas se pueden atribuir a subunidades componentes de legumina y vicilina. Según lo descrito por Shevkani y Singh (2015), las bandas 2, 3 y/o 4 podrían atribuirse a vicilina, una proteína oligomérica que consiste en tres subunidades polipeptídicas de entre 43 y 53 kDa. La banda 1 podría corresponder a las subunidades del hexámero legumina que tienen una MM de alrededor de 60 kDa. Las bandas 5 a 14 pueden ser atribuidas a diversas albúminas. Lu, Quillien y Popineau (2000) mostraron que el perfil SDS-PAGE de la fracción albúmina de arvejas contenía esencialmente dos grupos de proteínas, una banda principal con masas alrededor de 30 kDa y varias bandas alrededor de 14 kDa y menores. Las glutelinas, en condiciones no reductoras, presentan bandas que se encuentran entre 50-67, 30-38 y 20-28 kDa (Gorinstein, Moshe, Greene y Arruda, 1991; Martínez y Añón, 1996). Finalmente, no podemos descartar la presencia de subunidades ácidas y básicas de legumina (37 y 25 kDa, respectivamente) como segmentos libres en las harinas. En el caso de HD, fue necesario realizar una tinción con plata de los geles ya que en la tinción con Coomassie Blue no se detectaban bandas. De esta manera, pudo registrarse que las bandas presentes en la harina desaparecieron (Figura 1A). Pudieron detectarse dos nuevas bandas (15 y 16) con MM 67 y 63 kDa, respectivamente, que podrían ser atribuidas a productos de hidrólisis de otros polipéptidos mayores que no ingresaban a los geles. La ausencia de otras bandas indica que la gran mayoría de los productos de digestión corresponderían a moléculas de baja MM que escapan de este gel. Cuando se analizaron las harinas fermentadas, se encontró que todos los perfiles electroforéticos fueron prácticamente iguales entre fermentos y respecto a la muestra sin fermentar (Figura 1C). Para detectar péptidos de menores masas moleculares, se realizaron electroforesis Tricina-SDS-PAGE donde se pudo observar que la harina contiene una gran variedad de péptidos con MM menores a 30 kDa. En el caso de HD se observó que las bandas que aparecían en la porción superior del gel ( $> 6$  kDa) disminuyen su intensidad indicando que fueron atacadas por las enzimas digestivas (Figuras 1B). En cuanto a HF se repitió el comportamiento analizado en las corridas SDS-PAGE; todos los fermentos y su muestra sin fermentar presentaron perfiles similares, observándose solo una disminución de la intensidad de una banda correspondiente a 26 kDa para la condición de fermentación 48 h/37°C (Figura 1D).

Las fracciones solubles fueron analizadas mediante cromatografía de filtración en gel para estudiar su composición molecular. En el caso del análisis de H mediante la columna Superdex 75 (límite de exclusión: 100 kDa), el pico más intenso apareció al volumen de exclusión correspondiendo a masas moleculares mayores a 100 kDa, es decir los oligómeros de globulinas intactos. Este pico se encuentra solapado, y tendría presencia de unidades constituyentes de las leguminas (globulinas 11S, tres dímeros constituidos por polipéptidos de 60 kDa que se mantienen unidos por enlaces no covalentes formados por subunidades ácidas y básicas asociadas por puentes disulfuro), ya que como puede observarse el máximo de este pico corresponde a moléculas con masas de 60 kDa; y a las vicilinas (globulinas 7S, trímeros formados por unidades de aproximadamente 50 kDa estabilizados por interacciones hidrofóbicas, enlaces electrostáticos y de hidrógeno). También pudo apreciarse presencia relevante de moléculas con masas entre 25 y 43 kDa, 11 y 16 kDa, 4 y 7 kDa y 2,7

a 4 kDa. Estos picos corresponderían fundamentalmente a albúminas y algunos péptidos menores. Luego de la digestión gastrointestinal simulada, se observó que hubo una disminución de los picos correspondientes a masas moleculares mayores a 10 kDa con la consecuente aparición de nuevos picos correspondientes a moléculas con masas menores a 10 kDa. Estas variaciones evidencian el ataque proteolítico producido durante la digestión gastrointestinal (Figura 2A).

En el caso de las HFs, se observó que todos los fermentos presentaron cromatogramas similares, la diferencia principal con la muestra HF0 fue un aumento del pico correspondiente al volumen de exclusión, lo que infiere la formación de agregados como se mencionó anteriormente (Figura 2C).

Con el fin de mejorar el análisis de las moléculas de baja masa molecular, se realizaron cromatografías con la columna Superdex 30 (rango de separación < 10 kDa). En el cromatograma correspondiente a H, se observó un pico correspondiente al volumen de exclusión de la columna (> 10 kDa) además apareció un pico correspondiente a moléculas con masas mayores a 6,5 kDa y pequeños picos que involucran moléculas entre 2 y 0,1 kDa. Luego de la digestión gastrointestinal, se observó una disminución de los picos con masas moleculares > 10 kDa indicando que parte de esas moléculas fueron atacadas por las enzimas. Además, se observó la aparición de un nuevo pico involucrando un amplio rango de moléculas menores a 4,3 kDa, pero con un máximo alrededor de 1,3 kDa, dos picos solapados (0,1-0,5 kDa, correspondientes a aminoácidos libres hasta péptidos de 4 aminoácidos), y otros dos pequeños picos de menores masas que sugieren la liberación de algún otro tipo de componente (no proteico) durante la digestión gastrointestinal (Figura 2B).

Por último, cuando analizamos las harinas fermentadas se observó un comportamiento similar en todas las muestras incluida la muestra sin fermentar donde la mayor proporción de moléculas aparecen con el volumen de elución (Figura 2D).

Finalmente, se llevó a cabo una primera aproximación a la evaluación de la actividad antioxidante de H, HFs y HD a través del análisis de sus fracciones solubles utilizando dos metodologías: método ORAC y método HORAC. Mediante el método ORAC es posible medir la capacidad “secuestrante” de radicales peroxilos (generados a partir de AAPH a 37°C) determinándose experimentalmente la degradación oxidativa de la fluoresceína utilizada como sonda fluorescente. Por lo tanto, la pérdida de fluorescencia es un indicativo del daño que está sufriendo la fluoresceína por su reacción con los radicales peroxilo. Aquellos compuestos con capacidad antioxidante protegerán a dicha molécula de la degradación oxidativa, inhibiendo o disminuyendo la pérdida de fluorescencia (Ou, Hampsch-Woodil, y Prior, 2001). En cuanto a HORAC, en este ensayo se determina la degradación oxidativa de la fluoresceína, que se descompone al reaccionar con los radicales hidroxilo generados in situ a partir de un metal divalente (Co<sup>+2</sup>) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con la consiguiente pérdida de fluorescencia. En el presente trabajo, se ensayaron las fracciones solubles de cada muestra en diferentes concentraciones a fin de obtener curvas dosis-respuesta. A partir de estas curvas (graficando % de inhibición de radicales en función de la concentración de proteína en la muestra), se obtuvieron los valores de IC<sub>50</sub> (concentración que inhibe el 50 % de los radicales) de cada muestra. El digerido gastrointestinal exhibió un valor de IC<sub>50</sub> en el ensayo ORAC 3 veces menor ( $p < 0,05$ ) que H. En el caso del ensayo HORAC, los valores de IC<sub>50</sub> para H y HD no mostraron diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre ellos (Tabla 3). Es importante remarcar, que aunque en los dos ensayos se utiliza la misma sonda fluorescente, las concentraciones que se evalúan son muy diferentes; el ensayo ORAC permite evaluar concentraciones mucho más bajas de las moléculas antioxidantes. En trabajos previos, Ou, Hampsch-Woodil, y Prior (2001) demostraron que el ensayo HORAC reflejaría principalmente la capacidad de los antioxidantes de quelar metales, inhibiendo de esta manera la formación de radicales OH•; mientras que, como ya se mencionó anteriormente, el ensayo ORAC mide la capacidad de secuestro de radicales peroxilo por interrupción de la cadena radicalaria, fundamentalmente a través de un mecanismo de donación de átomos de hidrógeno. Estas diferencias en la sensibilidad y en los mecanismos de acción de los compuestos activos entre ambos métodos utilizados en este trabajo podrían explicar diferencias de comportamientos luego de la digestión gastrointestinal entre ambos métodos. Todos los fermentos registraron un aumento de actividad antioxidante respecto de la dispersión inicial presentando valores de IC<sub>50</sub> entre 1,3 y 2 veces menores; los fermentos obtenidos a 37°C por 48 h y a 30°C por 24 h presentaron la mayor capacidad antioxidante sin diferencias significativas entre ellos ( $p < 0,05$ ).

Dichos valores son comparables con los obtenidos luego de someter a la harina a un proceso de simulación de la digestión gastrointestinal. Por lo tanto, de acuerdo con estos primeros ensayos se puede inferir que el proceso de fermentación generaría una proteólisis parcial que liberaría péptidos con actividad potencialmente antioxidante. Torino et al. (2013) informaron que la fermentación nativa de lentejas produjo un aumento de los grupos amino libres (medidos por el método de TNBS, de 0,6 mmol Leu/g a 1,5 mmol Leu/g) durante las primeras 48 h y no se observaron cambios posteriores. En consecuencia, observaron también un aumento significativo de la actividad antioxidante medida por el método de ORAC.

En este trabajo, se pudo verificar que tanto la digestión gastrointestinal simulada como la fermentación generaron un aumento de la actividad antioxidante, generando productos de similar capacidad antioxidante de acuerdo con el ensayo ORAC a pesar que el grado de proteólisis fue significativamente menor en las HFs y que la composición molecular fue diferente. Una posible explicación para estos hechos es que péptidos/polipéptidos de diferentes tamaños estarían ejerciendo actividades comparables. Tampoco puede descartarse que el aumento de actividad registrado luego de la fermentación corresponda no sólo a la presencia de péptidos, sino que podría estar relacionada con otros compuestos no proteicos que fueron liberados o modificados por el proceso de fermentación.

## CONCLUSIONES

La literatura sobre la actividad antioxidante de péptidos de arvejas es muy escasa y hasta donde conocemos, el estudio de dichos péptidos liberados a partir de un proceso de simulación de la digestión gastrointestinal no había sido estudiado hasta ahora. Los resultados obtenidos en ese sentido han sido muy alentadores posicionando a la harina de arveja como un ingrediente potencialmente antioxidante. También se realizaron los primeros avances en el estudio del proceso de fermentación autóctona de la harina y la posibilidad de utilizar la misma como otro ingrediente con características antioxidantes. Este es un tema que está en crecimiento y del cual tampoco se ha estudiado mucho. En el presente trabajo, se realizó los primeros ensayos de fermentación con la intención de seleccionar las condiciones del proceso. Los resultados obtenidos mostraron que este tipo de fermentaciones puede ser una herramienta interesante para mejorar las propiedades antioxidantes de las harinas de arvejas; estos estudios serán profundizados a futuro en nuestro laboratorio.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por un proyecto del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PUE16-22920160100033CO) y por un proyecto

**Tabla 1:** Se muestra los valores de GH (TNBS), PT (microKjeldahl), PS (Lowry) y solubilidad en buffer PBS (pH: 7,4) de todas las muestras

Muestra	Grado de hidrólisis (GH)(%)	Proteína total (PT) (%p/p)	Proteína soluble (PS) (mg/mL)	Solubilidad (g PS/100g PT)
H	-	18 ± 1*	1.3 ± 0.1*	70 ± 3 <sup>b</sup>
HD	29 ± 2	16 ± 2*	1.2 ± 0.1*	77 ± 10 <sup>b</sup>
HF <sub>0</sub>	-	6,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,03 <sup>a</sup>	68 ± 4 <sup>b</sup>
HF <sub>24,30</sub>	16,8 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,04 <sup>b</sup>	52 ± 5 <sup>a</sup>
HF <sub>48,30</sub>	17 ± 2 <sup>a</sup>	7,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,63 ± 0,04 <sup>b</sup>	54 ± 4 <sup>a</sup>
HF <sub>24,37</sub>	13 ± 2 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,63 ± 0,03 <sup>b</sup>	54 ± 3 <sup>a</sup>
HF <sub>48,37</sub>	13 ± 2 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,05 <sup>b</sup>	57 ± 8 <sup>a</sup>

H: harina de arveja; HD: harina de arveja digerida; HF: harina de arveja fermentada (cada subíndice corresponde a las condiciones de fermentación). Los resultados se expresan como el promedio ± SD de dos determinaciones. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

**Tabla 2:** Variación de pH durante la fermentación

Temperatura (°C)	tiempo (h)	pH
30	0	6,25 ± 0,01 <sup>c</sup>
	24	5,1 ± 0,1 <sup>b</sup>
	48	3,94 ± 0,06 <sup>a</sup>
37	0	6,23 ± 0,04 <sup>c</sup>
	24	4,7 ± 0,2 <sup>b</sup>
	48	3,9 ± 0,1 <sup>a</sup>

Los resultados se expresan como el promedio ± SD de dos determinaciones. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

**Tabla 3:** Valores de  $IC_{50}$  obtenidos por el método de ORAC para todas las muestras y por el método de HORAC para H y HD.

Muestra	$IC_{50}$ (mg/ml)	$IC_{50}$ HORAC (mg/ml)
H	0.24 ± 0.08 <sup>d</sup>	5 ± 1 <sup>a</sup>
HD	0.08 ± 0.01 <sup>a</sup>	3 ± 1 <sup>a</sup>
HF <sub>0</sub>	0,128 ± 0,004 <sup>c</sup>	-
HF <sub>24,30</sub>	0,071 ± 0,003 <sup>a</sup>	-
HF <sub>48,30</sub>	0,093 ± 0,004 <sup>b</sup>	-
HF <sub>24,37</sub>	0,087 ± 0,005 <sup>b</sup>	-
HF <sub>48,37</sub>	0,066 ± 0,002 <sup>a</sup>	-

H: harina de arveja; HD: harina de arveja digerida; HF: harina de arveja fermentada (cada subíndice corresponde a las condiciones de fermentación). Los resultados se expresan como el promedio ± SD de dos determinaciones. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

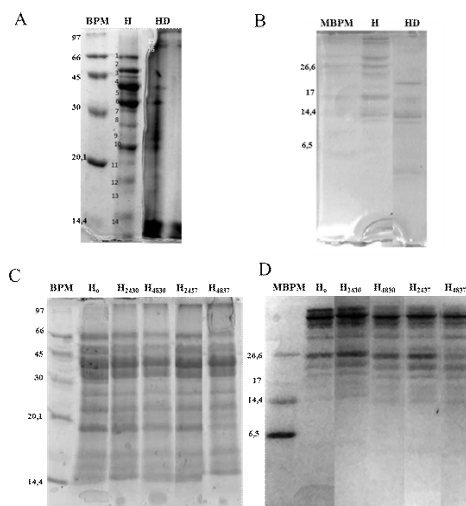


Figura 1: Electroforesis SDS-PAGE (A y C); Tricina-SDS-PAGE (B y D). BPM: patrón de bajo peso molecular. H: harina de arveja; HD: harina de arveja digerida; HF: harina de arveja fermentada (cada subíndice corresponde a las condiciones de fermentación). MBPM: patrón de muy bajo peso molecular



## BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzene-sulfonic acid. *J Agr Food Chem*, 27(6): 1256–1262.
- Agboola, S, Mofolasayo, O, Watts, B, Aluko, R. (2010). Functional properties of yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed flours and the *in vitro* bioactive properties of their polyphenols. *Food Res Int*, 43: 582–588.
- AOAC (1990). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (W. Horwitz, Ed.), 15th edn, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, U.S.A.
- Barbana, C, Boye, J I. (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chem* 127: 94–101.
- Blum, H, Beier, H, Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Boye, J I, Zare, F, Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Res Int*, 43: 414–431
- Cipollone MA, Tironi VA. (2020). Yellow pea flour and protein isolate as sources of antioxidant peptides after simulated gastrointestinal digestion. *Legume Science*. e59. <https://doi.org/10.1002/leg3.59>
- Cubero, J I, Moreno, M T. (1983). *Leguminosas de grano*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España, pp 31-47.
- Gobbetti, M, De Angelis, M, Di Cagno, R, Calasso, M, Archetti, G, Rizzello, C G. (2019). Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation. *Int J Food Microbiol*, 302: 103-113.
- Gorinstein, S, Moshe, R, Greene, L J, Arruda, P. (1991). Evaluation of four amaranthus species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition. *J Agric. Food Chem*, 39: 851-854
- Granito, M, Frias, J, Doblado, R, Guerra, M, Champ, M, Vidal-Valverde, C. (2002) Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation. *Eur Food Res Technol*, 214: 226–231
- Gueguen, J, Barbot, J. (1988). Quantitative and qualitative variability of pea (*Pisum sativum* L.) protein composition. *J Sci Food Agr*, 42: 209–224
- Horubala, A., (1999). Antioxidant capacity and their changes in fruit and vegetables processing. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.* 3: 30-31.
- Lowry, O H, Rosebrough, N J, Farr, A L, Randall, R J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1): 265-75
- Lu, B-Y, Quillien, L, Popineau, Y. (2000). Foaming and emulsifying properties of pea albumin fractions and partial characterisation of surface-active components. *J Sci. Food Agric.* 80: 1964-1972.
- Martínez, E N, Añón, M C. (1996). Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study. *J Agric. Food Chem*, 44: 2523-2530
- Minekus, M, Alminger, M, Alvito, P, Balance, S, Bohn, T, Bourlieu, C, Carrière, F, Boutrou, R, Corredig, M, Dupont, D, Dufour, C, Egger, L, Golding, M, Karakaya, S, Kirkhus, B, Le Feunteun, S, Lesmes, U, Macierzanka, A, Mackie, A, Marze, S, McClements, D J, Ménard, O, Recio, I, Santos, C N, Singh, R P, Vegarud, G E, Wickham, M S, Weitschies, W, Brodkorb, A. (2014) A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. *J. Funct. Food*, 5(6):1113-24
- Orsini Delgado, M, Galleano, M, Añón, M, Tironi, V. (2015). Amaranth peptides from gastrointestinal digestion: Antioxidant activity against physiological reactive species. *Plant Foods Hum Nutr*, 70:27–34.
- Orsini Delgado, M, Tironi, V, & Añón, M. (2011). Antioxidant activity of amaranth proteins or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT-Food Sci Technol*, 44: 1752–1760.
- Ou, B, Hampsch-Woodil, M, Prior, R. (2001). Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agr Food Chem*, 49: 4619-4626
- Pownall, T L, Udenigwe, C C, Aluko, R E. (2010). Amino Acid Composition and Antioxidant Properties of Pea Seed (*Pisum sativum* L.) Enzymatic Protein Hydrolysate Fractions. *J Agr Food Chem.*, 58: 4712–4718

Salunkhe, D K, Sathe, S K, Reddy, N R. (1989). *Lipids*. En: D.K. Salunkhe and S.S. Kadam (eds), *Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology and Utilization*, Boca Raton, FL, CRC Press, 99–116

Schägger, H. (2006) *Tricine-SDS-PAGE*. *Nature Protocols volume 1*: 16–22.

Shevkani, K, Singh, N. (2015) *Relationship between protein characteristics and film-forming properties of kidney bean, field pea and amaranth protein isolates*. *Int. J Food Sci Technol*, 50: 1033–1043

Southgate, D A T. (1976). *Determination of food carbohydrates*. London: Applied Science Publishers, Book.

Tabbaco, A, Meiattini, F, Moda, E, Tarli, P. (1979). *Simplified enzymic colorimetric serum urea nitrogen determination*. *Clin. Chem*, 25: 336-337

Torino, M I, Limón R I, Martínez-Villaluenga, C, Mäkinen, S, Pihlanto, A, Vidal-Valverde, C, Frias, J. (2013) *Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils*. *Food Chem*, 136: 1030–1037.

Zulet, M A, Martínez, J A. (2001). *Mediterranean diet: Legumes and cholesterolemia*. *Rev Chil Nutr*, 28: 312–320.