

Obtención y caracterización de péptidos antioxidantes a partir de preparados comerciales de levaduras secas inactivas

Eva M. González-Rompinelli, Blanca Hernández-Ledesma, Juan J. Rodríguez-Bencomo, Pedro J. Martín-Álvarez, M. Ángeles Pozo-Bayón, M. Victoria Moreno-Arribas*

*Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM
c/ Nicolás Cabrera, 9. Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid. Tel. 910017902. E-mail: victoria.moreno@csic.es*

Resumen

El empleo de preparados de levaduras secas inactivas (LSI) se ha generalizado en la industria enológica para mejorar las características organolépticas del vino, aunque los mecanismos implicados no han sido totalmente identificados. Recientemente, en nuestro laboratorio, se ha comprobado que los preparados LSI ricos en glutatión (GSH) inducen una menor evolución del color, así como cambios en la composición fenólica y el aroma de los vinos. Este efecto se ha relacionado con la actividad antioxidante del GSH, aunque también podría deberse a otros péptidos de bajo peso molecular procedentes de la levadura. En este trabajo se ha obtenido, mediante ultrafiltración, la fracción peptídica <3000Da de preparados de LSI indicados para distintos tipos de vino, llevándose a cabo su posterior fraccionamiento por HPLC a escala preparativa. La actividad antioxidante de las cuatro subfracciones obtenidas se ha determinado mediante el método de captación de radicales peroxilo (ORAC). La fracción que mostró mayor actividad antioxidante se ha seleccionado para llevar a cabo la identificación y caracterización de los péptidos presentes, comprobándose que el GSH no eluye en dicha fracción, lo que sugiere la existencia de otros péptidos con potente actividad antioxidante que podrían contribuir a las propiedades de los preparados de LSI.

Palabras clave: vino, levaduras secas inactivas, péptidos, actividad antioxidante, glutatión

1. Introducción

El empleo de preparados de levaduras secas inactivas (LSI) en vinificación es una práctica cada vez más extendida entre los elaboradores debido a las múltiples propiedades que este tipo de preparados puede aportar a los vinos. Entre otras, cabe destacar su empleo como nutrientes fermentativos y/o como protectores durante la hidratación de las levaduras secas activas empleadas en la fermentación, aunque también se ha descrito su papel en la estabilización del color e incluso para potenciar las características aromáticas del vino [1]. En los últimos años han aparecido en el mercado enológico preparados de LSI indicados para preservar el aroma y el color de los vinos durante el almacenamiento. El efecto protector de estas preparaciones ha sido asociado a la presencia de una importante cantidad de glutatión (GSH) en los mismos. El GSH es un tripeptido de origen no proteico sintetizado por la levadura y que puede ser liberado al medio durante la lisis de la célula. El tratamiento de los vinos con GSH como práctica enológica, se encuentra en la actualidad en estudio por parte de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). Aunque se ha comprobado que la adición de GSH inmediatamente después del embotellado, puede limitar la oxidación de ciertos toiles volátiles en vinos blancos [2], el papel de LSI ricos en glutatión (LSI-GSH) en el vino apenas ha sido evaluado. Recientemente, se ha comprobado en nuestro laboratorio que el GSH podría no estar involucrado en la preservación de algunos aromas varietales en medios vinicos sintéticos [3], por lo que otros compuestos presentes en estos preparados, principalmente de naturaleza peptídica, podrían ser los responsables últimos del efecto observado.

El objetivo de este trabajo es comprobar la existencia de un posible efecto antioxidante de péptidos aislados de un preparado comercial LSI-GSH del que previamente se sabe que es capaz de reducir la oxidación de algunos aromas varietales en vinos sintéticos.

2. Material y Métodos

2.1 Obtención de la fracción < 3000 Da de preparados de levaduras secas inactivas (LSI)

Cuatro gramos de una preparación enológica comercial de LSI-GSH, se solubilizaron en 25 mL de solución hidroalcohólica (EtOH:H₂O 12% v/v) y se sometieron a una etapa de extracción por ultrasonidos. A continuación la mezcla se centrifugó y el sobrenadante se sometió a dos etapas de ultrafiltración sucesivas empleando membranas de tamaño de corte <10.000 Da y <3000 Da, respectivamente. El permeado obtenido (fracción < 3000 Da) se recogió, liofilizó y almacenó congelado hasta el momento de su empleo.

2.2 Obtención de las subfracciones < 3000 Da mediante HPLC a escala preparativa

La fracción < 3000Da se reconstituyó en agua a una concentración de 20mg/L y se analizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) a escala preparativa, empleando el método descrito en Hernández y colaboradores [4], modificado para este tipo de muestras. Para ello se empleó un equipo constituido por una bomba 600 Controller, un inyector automático 717 plus, un detector 996 de fotodiodos alineados y un horno de columna (Waters Corporation, Milford, MA, USA). La separación se llevó a cabo en una columna Prep Nova-Pak HR C18 de Waters, de 300 mm de longitud x 7,8 mm d.i., 60 Å, 4 µm. El volumen de muestra empleado fue de 400 µL. Para el control de los equipos, tratamiento y procesado de datos, se empleó el programa Millennium v32 (Waters). El eluyente A consistió en 0,1% de ácido trifluoroacético en agua y el eluyente B en 0,08% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo. El flujo utilizado ha sido de 1 mL/min y la temperatura de la columna 25° C. Se realizaron un total de 4 inyecciones de la fracción <3000 Da aislada del LSI-GSH, y las sub-fracciones (de entre 10 y 20 mL) se recogieron cada 10 minutos, se congelaron a -80° C y liofilizaron para su posterior análisis. El contenido en péptidos de las sub-fracciones recogidas se determinó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL, USA) usando albúmina serovina como patrón.

2.3 Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó por el método de la capacidad de captación de radicales de oxígeno (ORAC)-fluoresceína (ORAC-FL) descrito en [5] con algunas modificaciones. Se empleó el ácido [6-Hidroxi-(2,5,7,8-tetrametil)croman]-2-carboxílico (Trolox) como antioxidante de referencia. La reacción tuvo lugar en placas de 96 pocillos (Biogen Científica S.L., España) con un volumen final de 200 µL, conteniendo FL (120µL, concentración final de 70 nM), Trolox a diferentes concentraciones (1-8 µM), o muestra, y una solución de AAPH (concentración final de 12 mM). La fluorescencia se midió cada minuto durante 80 minutos en un equipo Fluostar Optima (BMG Labtechnologies GMBH, Offenburg, Germany) con una longitud de onda de excitación de 485 nm y de 520 nm de emisión. El equipo se controló con el software Fluostar Optima 1.32 R2. El valor final de ORAC-FL se ha expresado como µmol de Trolox equivalente por cada mg de proteína. Los ensayos se repitieron por triplicado para cada muestra.

3. Resultados y Conclusiones

3.1 Fraccionamiento de los péptidos antioxidantes de la fracción < 3000 Da

En la figura 1A se muestra el cromatograma correspondiente a la fracción < 3000 Da aislada del preparado de LSI-GSH, así como el pico correspondiente a la elución del glutatión. Se aislaron cuatro

subfracciones denominadas F1, F2, F3 y F4. En la F1 se encontrarían fundamentalmente los péptidos más polares y de mayor peso molecular, y en la F4 los más apolares y de menor peso molecular. El análisis del contenido peptídico mediante el método del BCA demostró que la subfracción F1 presentó la mayor concentración (6,39 mg/mL), mientras que la subfracción F3 presentó la menor concentración (0,31 mg/mL). Estos resultados corroboran que la mayor parte de estos preparados está constituida por péptidos de pequeño peso molecular (incluido en glutatión) que como se ha comprobado se liberan al medio inmediatamente tras su adición al vino [6]. Las subfracciones F2 y F4 presentaron valores intermedios de contenido peptídico, de 0,49 mg/mL (F2) y 0,47 mg/mL (F4).

3.2. Actividad antioxidante de las fracciones aisladas del preparado LSI-GSH

La actividad antioxidante de las fracciones F1 a F4 se determinó mediante el método ORAC, que evalúa la capacidad de la muestra de captar radicales peroxilo. Los valores de ORAC, expresados como μmol equivalente de Trolox/mg proteína se muestran en la figura 1B. La mayor actividad antioxidante se observó para la subfracción F2, con un valor de ORAC de 1,542 μmol equivalente de Trolox/mg de proteína. Las subfracciones F1, F3 y F4 presentaron valores similares de ORAC, 0,61 μmol equivalente de Trolox/mg de proteína (F1), 0,72 μmol equivalente de Trolox/mg de proteína (F3) y 0,58 μmol equivalente de Trolox/mg de proteína (F4).

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo muestran, por primera vez, que la actividad antioxidante atribuida a preparados de LSI ricos en glutatión podría no ser tanto debida a la presencia de glutatión, sino también a otros péptidos de bajo peso molecular presentes fundamentalmente en la subfracción F2 y que podrían no ser específicos de este tipo de preparados. Actualmente se trabaja en la caracterización de estos péptidos empleando técnicas de espectrometría de masas y su posterior secuenciación, y ensayos de oxidación en medios vínicos sintéticos.

4. Bibliografía

- [1] Pozo-Bayón, M.A., Andujar-Ortiz I. & Moreno-Arribas M.V. (2009) Scientific evidences beyond the application of inactive dry preparations in winemaking. *Food Res. Int.*, 42, 754-761
- [2] Lavigne-Cruege, V., Pons, A., Chone, X. & Dubourdieu, D. (2003). Rôle du glutathion sur l'évolution aromatique des vins blancs secs. In: *Oenologie VII symposium International d'oenologie*. Ed. Tec&Doc, pp. 385-388.
- [3] Rodríguez-Bencomo J.; Andujar-Ortiz I.; Moreno-Arribas M.V. & Pozo-Bayón M.A.. Effect of isolated fractions from glutathione-enriched-inactive dry yeast on the oxidation of wine terpenes (2011). En: *Wine Active Compounds 2011, Proceedings of the 2nd edition of the International Conference Series on Wine Wine active compounds*. Editors: David Chassagne and Regis Gougeon. *Oeno Pluri MEDIA, AC symposium, Francia*. Pg. 91-93
- [4] Hernández-Ledesma B., Dávalos, A., Bartolomé, B. & Amigo L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J.Agric. Food Chem.*, 53, 588-593.
- [5] Dávalos, A.; Gómez-Cordovés, C. & Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC Fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 48-54.
- [6] Pozo-Bayón, M.A., Andujar-Ortiz, I., Alcaide-Hidalgo, JM & Moreno-Arribas, MV. (2009). Characterization of commercial inactive dry yeast preparations for oenological use based on their ability to release soluble compounds and on their behavior towards aroma compounds in model wines. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 10784-10792.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen a las Empresas que han proporcionado los preparados comerciales de levaduras secas inactivas.

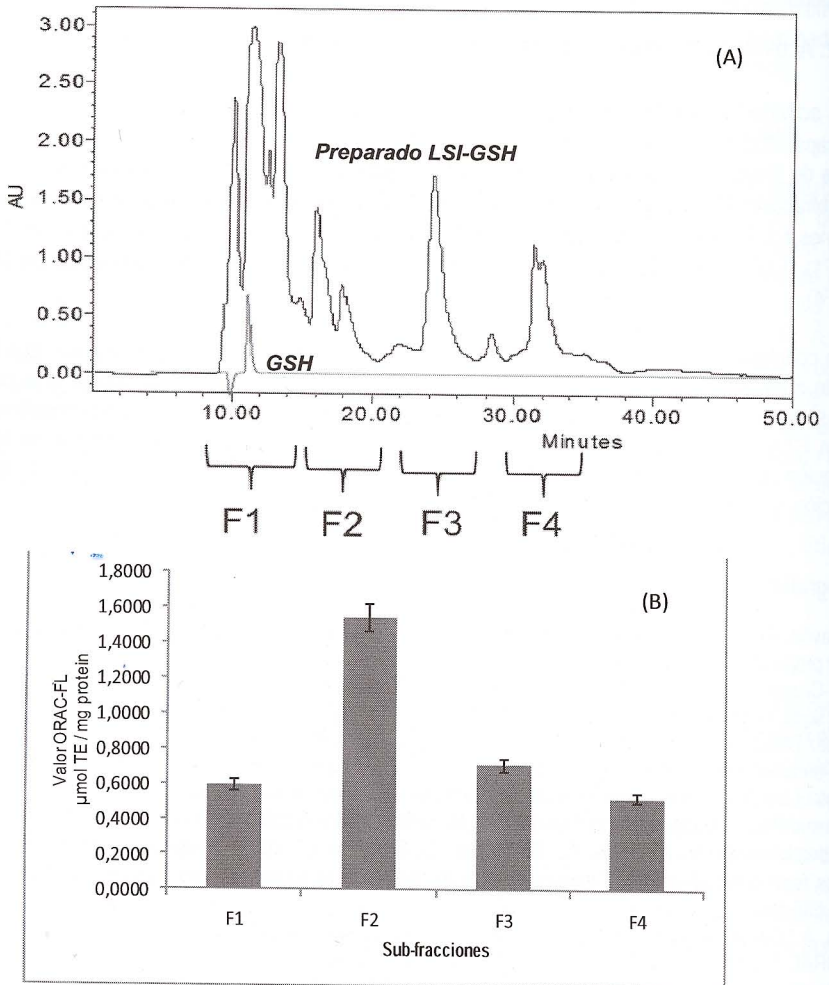


Figura 1. (A) Fraccionamiento por RP-HPLC preparativa del permeado < 3000 Da del preparado de LSI rico en glutatión (LSI-GSH). (B) Valor ORAC-FL de las sub-fracciones F1-F4 recogidas del RP-HPLC preparativo.