

Determinación de la actividad de lipoxigenasas en hígados de merluza

Por **Lucía Margenat, Iván Jachmanián y María A. Grompone***

Laboratorio de Grasas y Aceites, Facultad de Química, Gral. Flores 2124,
11800 Montevideo, Uruguay.

RESUMEN

Determinación de la actividad de lipoxigenasas en hígados de merluza.

En el presente trabajo se realizaron estudios para confirmar la existencia de lipoxigenasas activas en los hígados de merluza, enzimas que pueden ser las promotoras del deterioro del aceite contenido en los hígados. Cuando una solución conteniendo una mezcla de ácidos grasos obtenidos a partir del aceite de girasol se incubó con el agregado de un extracto acuoso obtenido a partir de los hígados de merluza, se verificó un gradual y continuo incremento en la concentración de hidroperóxidos en la mezcla. La velocidad de oxidación de los ácidos grasos en las incubaciones resultó directamente proporcional a la cantidad de extracto agregado, pudiendo ser eficientemente disminuida por el agregado de antioxidantes. La actividad lipoxigenante encontrada en los hígados de merluza es del orden de 100.000 veces menor a la que se determina por el mismo método para los porotos de soja. El rango óptimo de actividad se obtiene en un rango de pH de 8.0 a 8.5.

PALABRAS-CLAVE: *Lipoxigenasa - Merluza - Oxidación.*

SUMMARY

Determination of lipoxigenase activity in hake liver.

Different studies were conducted to confirm the presence of active lipoxigenases in hake liver. These enzymes may be responsible for the rapid oxidation of oil contained in the liver. Incubation of a solution of free fatty acids obtained from sunflower oil with an aqueous extract obtained from hake liver resulted in a steady increase in the concentration of hydroperoxides. A linear correlation was determined between extract concentration and the rate of oxidation of free fatty acids. The addition of antioxidants led to a sharp reduction in the rate of oxidation. The lipoxigenase activity in hake liver was found to be 100,000 times smaller than for soybeans -as determined under the same experimental conditions. Optimum activity was found in the pH range of 8.0 to 8.5.

KEY-WORDS: *Hake - Lipoxigenase - Oxidation.*

1. INTRODUCCIÓN

La merluza pertenece a la familia *Merlucciidae*, que junto con otras familias integran el orden *Gadiformes*. Dentro de esta familia está descrito un único género, *Merluccius*. La especie *Merluccius hubbsi* se encuentra ampliamente distribuida en el Río de la Plata y en la zona común de pesca uruguayo-argentina del Océano Atlántico Sudoccidental. Es uno de los recursos pesqueros más explotados en el Uruguay (Méndez, 1993).

Los hígados de merluza representan un 7% del peso del pescado entero y presentan un alto conte-

nido de aceite, el que puede variar entre un 35 y un 50% según la época del año. Pese a constituir una rica fuente de aceite, en general, estos hígados son sub-aprovechados en el Uruguay, destinándose junto con los demás restos de la faena a usos de poca importancia económica (Rodríguez *et al.*, 1993, Grompone, 1992). Este aceite, al igual que casi todos los aceites de pescados del Río de la Plata, presenta un contenido en DHA superior al del EPA, lo que lo hace diferente a los que se suelen comercializar en Europa y USA. (Grompone, 1992). Esto hace al aceite de hígado de merluza particularmente atractivo para los tratamientos terapéuticos o profilácticos que requieran un suministro importante de DHA. Actualmente este aceite se está produciendo y comercializando en el Uruguay para uso veterinario pues se han encontrado efectos beneficiosos, por ejemplo, sobre la preñez de las vacas y de las ovejas o sobre la calidad del pelaje de los caninos; se encuentra también en proceso de habilitación para su uso humano.

El alto grado de insaturación de este aceite lo hace muy susceptible de sufrir procesos de oxidación, lo que ha sido resuelto mediante el agregado adecuado de ciertos antioxidantes. Sin embargo, uno de los mayores problemas que se presentan para la explotación del aceite de hígado de merluza es el de mantener su calidad y evitar que sufra algún deterioro en el período que va desde el momento de la captura del pez hasta que el aceite es extraído y almacenado adecuadamente. En general, para minimizar este posible deterioro, los hígados son congelados luego de la faena y conservados así hasta el momento en que se extrae el aceite. A pesar de ello, se ha verificado un considerable deterioro del aceite contenido en hígados almacenados a una temperatura de -20°C luego de un período de algunos meses, deterioro que es sustancialmente mayor que el del aceite extraído del hígado y mantenido a la misma temperatura por el mismo período de tiempo. Se ha sugerido como una explicación de este rápido deterioro la posible presencia en los hígados de enzimas del tipo de las lipoxigenasas, las que podrían permanecer activas aún en los hígados almacenados. (Grompone *et al.*, 2004). Estas enzimas desempeñan un papel fisiológico en el pez que involucra procesos de oxidación de lípidos.

Se conoce como **lipoxigenasas** (EC 1.13.11.12) a un amplio grupo de enzimas que se caracterizan por catalizar la oxigenación de los lípidos que contienen un sistema *cis-cis*-1,4-pentadieno, para formar hidroperóxidos conjugados, proceso para el cual utilizan oxígeno molecular. Las primeras referencias a este tipo de enzimas aparecieron en estudios realizados sobre extractos obtenidos a partir de porotos de soja, por lo que las lipoxigenasas de soja son de las más ampliamente estudiadas e identificadas. Posteriormente fueron reportadas otras fuentes de lipoxigenasas en tejidos vegetales de diferente origen y también en algunos tejidos de origen animal. En particular son numerosos los trabajos realizados sobre las características de las lipoxigenasas en las branquias y en la piel de diferentes peces (Hsieh *et al.*, 1988). En estos trabajos se demostró que estas enzimas pueden catalizar la conversión de los ácidos grasos poliinsaturados, característicos de los peces, a sus correspondientes hidroperóxidos. Esta evidencia refuerza la hipótesis de que en el caso del deterioro del aceite contenido en los hígados de merluza esté involucrada alguna enzima de este tipo.

El conocimiento de las causas que provocan el deterioro del aceite en el hígado permitirá estudiar mecanismos para evitarlo, inhibirlo o detenerlo. Por ejemplo, una posible solución planteada por la industria consiste en almacenar los hígados en atmósfera de nitrógeno. Ese procedimiento puede ser adecuado o no según sea el fenómeno que tiene lugar, lo cual implica conocer la naturaleza de las enzimas involucradas y la cinética de la reacción que ellas catalizan.

Los objetivos de este trabajo son: verificar la presencia de lipoxigenasas en el hígado de merluza, medir el nivel de actividad de estas enzimas y compararlo con la de las lipoxigenasas presentes en porotos de soja, de las cuales se cuenta con numerosa información bibliográfica; determinar el efecto del pH sobre la actividad enzimática.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Obtención del extracto de hígado de merluza

Una muestra de aproximadamente 50 gramos de hígados de merluza picados se homogeneizó en un equipo Ultra Turrax con 100 mL de buffer fosfato de pH 7,8. A 15 mL de dicho homogenato se le agregó un volumen igual de diclorometano y se lo centrifugó a 4000 rpm por aproximadamente 2 horas. La capa superior acuosa, fracción denominada "extracto de hígado de merluza", se guardó a aproximadamente -20°C .

2.2. Obtención del extracto de porotos de soja

Se homogeneizó una muestra de porotos de soja molidos, de aproximadamente 18 gramos, en un

equipo Ultra turrax con 80 mL de agua. El homogenato se centrifugó a 4000 rpm durante aproximadamente 4 horas. La solución sobrenadante, denominada "extracto de soja", se guardó a aproximadamente -20°C .

2.3. Obtención de los ácidos grasos del aceite de girasol

Los ácidos grasos para el ensayo de actividad se obtuvieron por saponificación con KOH del aceite de girasol y posterior acidificación con HCl, de acuerdo con Rahmatullah *et al.* (1994).

2.4. Ensayos de actividad

En base a lo publicado por Grossman y Zakut (1979), para las medidas de actividad se eligió el método espectrofotométrico en el que se incubaba una solución de ácido linoleico en presencia del extracto enzimático y se mide la absorbancia a 234nm, longitud de onda característica de los dienos conjugados. Por este método, la presencia de la enzima se manifiesta por su acción peroxidante sobre el ácido linoleico que conduce a la formación de hidroperóxidos los cuales, por una reacción secundaria, dan lugar a dienos conjugados responsables del incremento de la absorbancia.

Se procedió de la siguiente manera: 6 mg de ácidos grasos de girasol se suspendieron en 25 mL de buffer del pH deseado y se agregaron 20 mg de Tween (emulsionante). La suspensión se ultrasonificó durante 1 hora, obteniéndose una solución límpida. Se colocaron 2,5 mL de esta solución en una celda espectrofotométrica de cuarzo de 1cm de paso y se agregaron diferentes volúmenes del extracto enzimático, según el ensayo. A partir de este agregado se comenzó a medir la absorbancia a 234 nm a distintos tiempos.

En algunas incubaciones se agregó un determinado volumen de solución etanólica de concentración 0.047mg/ml del antioxidante TENOX GT-2 (Eastman Chemical Company, Kingsport, USA), el cual consiste en un concentrado de δ -, α -, y β - tocoferoles.

Se definió como una unidad de enzima al cociente de la variación de la absorbancia por el tiempo de incubación (medido en minutos): $1\text{UE} = \Delta \text{Absorbancia} / \Delta t(\text{min})$. La actividad se expresó en unidades de enzima por miligramo de material de partida (soja o hígados de merluza), siendo sus unidades UE mg^{-1} .

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra la absorbancia medida a 234 nm en función del tiempo de incubación, para seis corridas realizadas a pH 8 con diferentes agregados de extracto de hígado de merluza (50, 100,

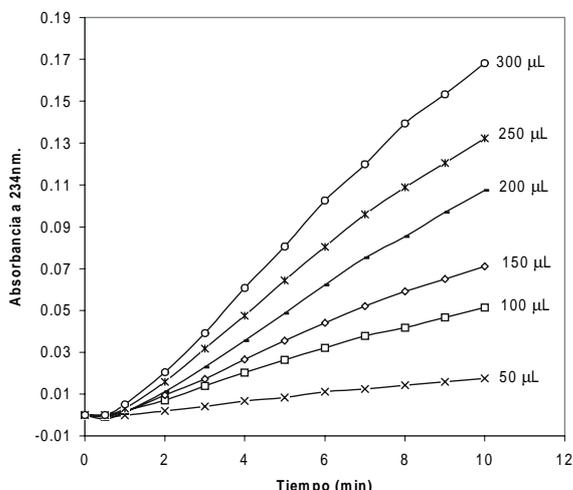


Figura 1
Variación de la absorbancia a 234 nm durante la incubación de los ácidos grasos de girasol con el agregado de diferentes volúmenes del extracto obtenido a partir de los hígados de merluza.

150, 200, 250 y 300 µL). De esta gráfica se deduce que la velocidad de aumento de la absorbancia y, en consecuencia, de la oxigenación del ácido linoleico, depende directamente de la concentración del extracto en la mezcla incubada. Esto demuestra la pre-

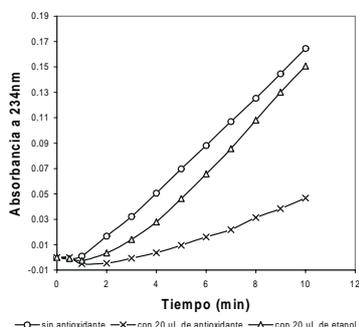
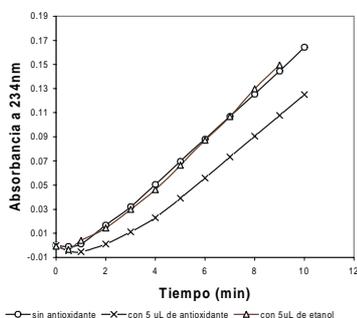


Figura 2
Incubaciones de 100 µL de extracto de hígado de merluza con el agregado de distintas cantidades de solución de antioxidante (TENOX GT-2, 0.047mg/ml). En el gráfico superior el agregado fue de 5 µL de solución o 5 µL del solvente de solución (etanol); en el gráfico inferior el agregado fue de 20 µL de solución de antioxidante o 20 µL del solvente de solución (etanol).

Tabla I
Actividad de las lipoxigenasas (UE/mg) de los hígados de merluza correspondiente a las incubaciones con ácidos grasos de girasol de la Figura 1. (*) 1UE = ΔAbsorbancia/Δt(min)

Volumen de extracto de hígado (µL)	Actividad (UE/mg) ^(*)
50	8×10^{-5}
100	11×10^{-5}
150	11×10^{-5}
200	12×10^{-5}
250	12×10^{-5}
300	13×10^{-5}

sencia en dicho extracto de enzimas lipoxigenantes activas, provenientes de los hígados de merluza utilizados para la preparación del mismo.

En la Figura 1 también se observa que todas las curvas presentan o un descenso o un valor constante de la absorbancia correspondiente a los primeros minutos de incubación, período luego del cual se comienza a verificar el incremento de la misma. Esto coincide con los resultados obtenidos por Koch et al. (1958), quienes verificaron esta misma tendencia en incubaciones con una pequeña cantidad de lipoxigenasa de soja purificada sobre ácido linoleico. Los autores adjudican este fenómeno a la existencia de un "período de inducción" en los primeros minutos de la incubación, seguido de una rápida oxidación.

En la Tabla I se muestran los resultados de la actividad enzimática para el hígado de merluza, calculada para cada una de las incubaciones de la Figura 1. Para los cálculos de las unidades de enzima (UE) en cada curva se descartaron los puntos correspondientes al período de inducción, y se determinó la pendiente de la parte lineal (donde $\Delta Abs/\Delta t = \partial Abs/\partial t$) mediante el método de mínimos cuadrados. La actividad enzimática en las condiciones de incubación no depende apreciablemente de la cantidad de extracto utilizado para las incubaciones ya que se encuentra en un valor en el entorno de las $11-12 \times 10^{-5}$ UE por miligramo de hígado. Esta proporcionalidad entre la pendiente de la recta (Absorbancia vs. Tiempo) y la cantidad de homogenato agregado confirma la presencia de enzimas en él y descarta la posibilidad de que esta reacción de oxidación se produzca espontáneamente, sin que el extracto participe catalizando dicho proceso.

Realizando el mismo tipo de incubación con el extracto obtenido a partir de porotos de soja se obtiene una actividad del orden de 1.5 UE por miligramo de porotos de soja. Esta diferencia en las

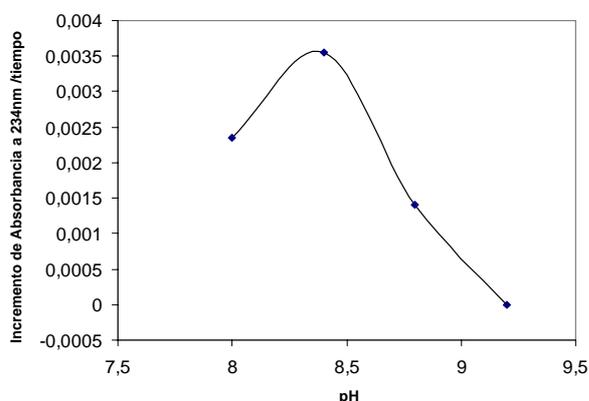


Figura 3

Incubaciones realizadas con un volumen constante de extracto de hígado de merluza a diferentes pH. Se grafica la velocidad de aumento de la absorbancia contra el pH.

actividades observadas en las incubaciones con ambos extractos podría indicar que la enzima se encuentra a una concentración muy superior en los porotos de soja que en los hígados de merluza o que, tratándose de lipoxigenasas de origen diferente, podrían tener actividades específicas distintas.

En la Figura 2 se observa que, en presencia del antioxidante, decrece la velocidad de aumento de la absorbancia, siendo este efecto más importante para el mayor agregado antioxidante. Esto confirma nuevamente que el incremento de absorbancia medido en las incubaciones se debe a la oxidación del aceite presente en la mezcla, oxidación que se encuentra retardada por el antioxidante agregado. En la Figura 2 también se muestran los resultados obtenidos cuando la incubación se realizó con el agregado del mismo volumen del solvente de la solución de antioxidante (etanol) pero sin éste. Se observa que si bien una cantidad apreciable del solvente (20 μ L) puede afectar la velocidad de oxidación, este efecto es sustancialmente menor que el que se determinó en presencia del antioxidante.

En la Figura 3 se puede observar que cuando se realizaron incubaciones a diferente pH, manteniendo constante la cantidad de extracto (30 μ L) de hígado agregado y teniendo por sustrato los ácidos grasos

de aceite de girasol, el rango óptimo de actividad se obtiene en un rango de pH de 8.0 a 8.5. La presencia de un pH óptimo es común en la actividad enzimática.

4. CONCLUSIONES

Del presente trabajo se puede concluir que: a) existen enzimas lipoxigenantes en los hígados de merluza pudiendo ser éstas las responsables del rápido deterioro que tiene el aceite en los hígados almacenados; b) la actividad de las mismas es considerablemente menor que la presente en otras fuentes conocidas de este tipo de enzimas (como los porotos de soja); y c) el rango óptimo de pH de dichas enzimas es de 8.0 a 8.5.

BIBLIOGRAFÍA

- Grompone, M. A. (1992) Aceites de pescado de interés nacional. *Ing. Quím.*, **3** (4), 14-19.
- Grompone, M. A., Pagano, T., Pinchak, Y., Harispe, R. (2004) Deterioro del aceite durante el almacenamiento de los hígados de merluza en comparación con el del aceite extraído de ellos. *Grasas y Aceites*, **55**, 291-295.
- Grossman, S., Zakut, R. (1979) Determination of Activity of Lipoxigenase. *Methods of Biochemical analysis*, **25**, 303-326.
- Hsieh, R.J., German, J.B., Kinsella, J.E. (1988) Lipoxigenase in Fish Tissue: Some properties of the 12-Lipoxigenase from Trout Gil.I. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 680-685.
- Koch, R. B., Stern B., Ferrari C.J. (1958) Linoleic Acid and Trilinolein as Substrates for Soybean Lipoxidase(s). *Arch. Biochem. Biophys.*, **78**, 165-179.
- Méndez Morales, E. (1993) Estudio de los lípidos extraídos de pescados de interés nacional y de sus posibles aplicaciones. Tesis de Magister en Química, Facultad de Química, Montevideo. Uruguay.
- Rahmatullah, M.S.K., Shukla, V.K.S. and Mukherjee, K.D. (1994) γ -linolenic acid concentrates from borage and evening primrose oil fatty acids via lipase-catalyzed esterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 569-573.
- Rodríguez, A., Jachmanián, I., Amaya, A., Grompone, M. A. (1993) Ácidos grasos poli-insaturados en filetes de pescados uruguayos. *Alimentos*, N^o1, **V18**, 15-19.

Recibido: Octubre 2004
Aceptado: Enero 2005