



Encuentro  
de JÓVENES  
INVESTIGADORES

## PROPIEDADES NEUROPROTECTORAS *IN VITRO* DE PÉPTIDOS EXTRAÍDOS A PARTIR DE LEVADURAS DE CERVEZA RESIDUAL

**Aquino, Marilin**

*Instituto de Tecnología de alimentos, Facultad de Ingeniería Química*

Director: Cian, Raúl  
Codirectora: Drago, Silvina

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: levadura de cerveza residual, acetilcolinesterasa, tirosinasa

### INTRODUCCIÓN

En la industria cervecera se producen grandes cantidades de residuos a lo largo de todo el proceso de elaboración. La levadura de cerveza residual (LCR) es el segundo subproducto en cantidad. Posee un alto contenido de proteínas, lo que la hace una fuente promisoría de péptidos bioactivos. Dentro de la fracción proteica, se destacan las manoproteínas (MP). Las mismas poseen residuos de manosas (glicoproteínas) que se localizan principalmente en la pared celular y poseen una amplia distribución de peso molecular: 5 a 10 kDa; 10 a 100 kDa y 100 a 400 kDa (Li y col., 2020). Las MP se pueden dividir en tres grupos: (i) unidas no covalentemente, (ii) unidas covalentemente al glucano estructural y (iii) unidas por puentes disulfuro a otras proteínas que están ligadas covalentemente al  $\beta$ -glucano de la pared celular. Se ha observado que las MP o sus péptidos pueden inhibir la enzima acetilcolinesterasa. En este sentido, estudios recientes han demostrado que los inhibidores de la acetilcolinesterasa alivian los síntomas neuropsiquiátricos en pacientes Alzheimer. Por otro lado, se ha observado que la inhibición de la enzima tirosinasa a nivel cerebral podría atenuar ciertas enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson, ya que se inhibe la producción de neuromelanina. Por lo mencionado, el estudio del efecto neuroprotector de las MP y sus péptidos adquiere gran relevancia. Más si se tiene en cuenta que pueden ser obtenidos en grandes cantidades a partir de un subproducto industrial.

Título del proyecto: Aplicaciones tecno y biofuncionales de manoproteínas extraídas a partir de un subproducto de la industria cervecera  
Instrumento: PICT-SERIE A-2020-01985  
Año de convocatoria: 2020  
Organismo financiador: Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT)  
Director: Cian, Raúl Esteban

### OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue obtener fracciones peptídicas endógenas de diferente peso molecular mediante ultrafiltración a partir de un extracto proteico de LCR y evaluar

la propiedades inhibitoras de los mismos frente a las enzimas acetilcolinesterasa y tirosinasa.

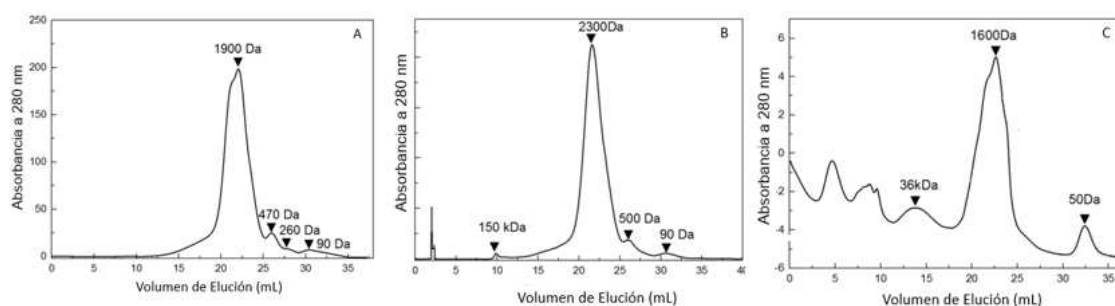
## METODOLOGÍA

Se trabajó con levadura de cerveza residual (LCR), a partir de ella mediante un tratamiento térmico se obtuvo un extracto proteico (P) rico en proteínas no unidas covalentemente. Para incrementar la pureza de las proteínas en el extracto se realizó una precipitación con etanol de acuerdo con Li y Karboune (2018) con algunas modificaciones. Al sobrenadante (S) obtenido del paso anterior se le realizó un proceso de fraccionamiento mediante ultrafiltración (UF), empleando para tal fin membranas de 10 y 5 kDa. El proceso de UF permitió obtener 3 fracciones: 1) F>10 kDa 2) F10-5kDa y 3) F<5 kDa. Tanto S como todas las fracciones obtenidas por UF fueron caracterizadas según su contenido de proteínas (Lowry y col. 1951) y el contenido de beta-glucanos (Zhang y Gu 1999). Para caracterizar las fracciones proteicas unidas a manosa, el sobrenadante S fue sometido a una cromatografía de afinidad unida a ConA. Luego de dicho proceso, se obtuvieron dos fracciones: S-F1 (proteínas no unidas a manosa) y S-F2 (manoproteínas), respectivamente. Además, todas las fracciones fueron caracterizadas de acuerdo con su masa molecular por FPLC según Cian y col. (2018). A todas las fracciones obtenidas mediante UF (F> 10 kDa, F>5kDa y F<5kDa) se les evaluó la capacidad inhibitoria frente a las enzimas tirosinasa (Takahashi y col., 2012) y acetilcolinesterasa (ACE) (Spontón y col., 2016).

## RESULTADOS/CONCLUSIONES

El extracto P presentó una proporción proteínas/sólidos de  $19,69 \pm 1,79$  g/100 g con un rendimiento proteico del  $28,06 \pm 1,06\%$ . Mediante la precipitación con etanol se logró aumentar la pureza proteica en S, siendo la relación proteínas/sólidos de  $35,74 \pm 2,48$  g/100 g. Por otro lado, el contenido de glicoproteína en S fue de  $32,34 \pm 0,45\%$ .

En la Figura 1 se muestra el perfil de pesos moleculares de P, S y S-F2. Para el caso de P, el tamaño medio de las fracciones proteicas fue de 1900 Da (Figura 1.A), mientras que para S fue de 2300 Da (Figura 1.B). Resulta oportuno agregar que las manoproteínas o manopéptidos presentes en S poseen distintos pesos moleculares, observándose tres picos mayoritarios en el perfil de S-F2 de 36, 1,6 y 0,05 kDa (Figura 1.C).



**Figura 1.** Perfil cromatográfico obtenido por FPLC de P (A), S (B) y S-F2 (C). Se muestran los tamaños moleculares (Da y kDa) de los picos más representativos.

Los valores de IC<sub>50</sub> para la inhibición de la enzima tirosinasa mediante la actividad monofenolasa para S, F> 10 kDa y F10-5kDa fueron:  $5,89 \pm 0,05$ ,  $21,80 \pm 0,06$  y  $27,21 \pm 0,01$  mg proteínas/mL respectivamente. Cabe señalar que F<5kDa no presenta actividad. Respecto a la inhibición de la tirosinasa mediante el mecanismo difenolasa, los valores de IC<sub>50</sub> para S, F10-5kDa y F<5kDa resultaron  $5,67 \pm 0,01$ ,  $24,38 \pm 0,01$ ,  $0,89 \pm 0,32$  mg proteínas/mL respectivamente. Por otro lado, F> 10 kDa no presenta actividad. Estos resultados indicarían que las fracciones proteicas de mayor tamaño

molecular poseen mayor actividad monofenolasa, mientras que las de menor tamaño presentan mayor actividad difenolasa. En este sentido, se ha visto que las propiedades estructurales de las cadenas laterales de los péptidos pueden desempeñar un papel importante en la inhibición de la enzima tirosinasa (Yap y col., 2021). Un elevado peso molecular y voluminosas cadenas laterales reducen la difusión peptídica hacia el sitio activo de la enzima, reduciendo la capacidad de inhibición del tipo difenolasa.

La IC50 para la inhibición de la ACE para S, F10-5kDa y F<5kDa fue:  $10,07 \pm 0,02$ ,  $5,79 \pm 0,02$  y  $4,47 \pm 0,03$  mg proteínas/mL, respectivamente. Sin embargo, la fracción la F> 10 kDa no presentó actividad. Este resultado indicaría que las fracciones peptídicas de menor tamaño molecular son las más activas frente a la enzima ACE. Al respecto, Malomo y col. (2019) reportaron que los péptidos de bajo PM presentan mayor actividad inhibitoria frente a ACE. A su vez, un menor tamaño molecular favorece su absorción intestinal y posible difusión a través de la barrera hematoencefálica.

Por último, las fracciones peptídicas endógenas, aisladas a partir extracto de LCR, poseen propiedades neuroprotectoras *in vitro* (inhibición de la actividad ACE y tirosinasa), la cual depende en parte del tamaño molecular.

Resulta necesario realizar más estudios para ponderar la bioaccesibilidad peptídica de dichas fracciones bioactivas, teniendo en cuenta el efecto de las enzimas gastrointestinales.

## BIBLIOGRAFIA BASICA

**Cian, R. E., Garzón, A. G., Martínez-Augustin, O., Botto, C. C., y Drago, S. R.** 2018. Antithrombotic activity of brewers' spent grain peptides and their effects on blood coagulation pathways. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(3), 241-246

**Li, J., y Karboune, S.** 2018. A comparative study for the isolation and characterization of mannoproteins from *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell wall. *International journal of biological macromolecules*, 119, 654-661.

**Li, J., Karboune, S., y Asehraou, A.** 2020. Mannoproteins from inactivated whole cells of baker's and brewer's yeasts as functional food ingredients: Isolation and optimization. *Journal of food science*, 85(5), 1438-1449

**Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J.** 1951. Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 256-275

**Malomo, S. A., y Aluko, R. E.** 2019. Kinetics of acetylcholinesterase inhibition by hemp seed protein-derived peptides. *Journal of food biochemistry*, 43(7), e12897.

**Spontón, P. G., Spinelli, R., Drago, S. R., Tonarelli, G. G., y Simonetta, A. C.** 2016. Acetylcholinesterase-inhibitor hydrolysates obtained from 'in vitro' enzymatic hydrolysis of mannoproteins extracted from different strains of yeasts. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(2), 300-308.

**Takahashi, M., Takara, K., Toyozato, T., y Wada, K.** 2012. A novel bioactive chalcone of *Morus australis* inhibits tyrosinase activity and melanin biosynthesis in B16 melanoma cells. *Journal of oleo science*, 61(10), 585-592. tyrosine residues. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(6), 607-613

**Yap, P. G., y Gan, C. Y.** 2021. Multifunctional tyrosinase inhibitor peptides with copper chelating, UV-absorption and antioxidant activities: Kinetic and docking studies. *Foods*, 10(3), 675.

**Zhang, Y., y Gu, W.** 1999. Determination of mannose in yeast by ultraviolet spectrometry. *Food and Fermentation Industries*, 25, 32-36