

BIOACCESIBILIDAD DE PÉPTIDOS NEUROPROTECTORES Y ANTIOXIDANTES OBTENIDOS A PARTIR DE LEVADURAS RESIDUALES DE CERVEZA

Gomez, María Inés¹

¹Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, UNL
Director/a: Dr. Raúl, Cian
Codirector/a: Aquino, Marilín

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: péptidos bioactivos, digestión gastrointestinal *in vitro*, fermentación colónica, FRAP, economía circular.

INTRODUCCIÓN

La levadura residual de cervecería es el segundo subproducto más importante de la industria cervecera. La misma posee un elevado contenido proteico (35-60% en base seca) (Li y col., 2020), siendo las manoproteínas la fracción proteica mayoritaria. Estas glicoproteínas contienen residuos de manosa en su estructura en una proporción que oscila entre 50% y 90% (Li y col., 2018, Spontón y col., 2016). Dado el elevado tenor proteico de este subproducto, y su elevada disponibilidad (residuo industrial), las levaduras residuales de cervecería constituyen una fuente promisoría para la obtención de péptidos bioactivos (Marson y col., 2020; Yang y col., 2015). Las enfermedades neurodegenerativas implican un daño neuronal, el cual deriva en un deterioro de los procesos cognitivos, ocasionado a largo plazo una disfunción del sistema nervioso central (Spontón y col., 2016). La enzima tirosinasa interviene en la síntesis de neuromelanina en el cerebro. Niveles por encima el umbral normal de esta enzima en este órgano ocasionan acumulación de melanoides en la sustancia nigra, favoreciendo la génesis de diversas patologías tales como Parkinson (Li y col., 2021). La enzima acetilcolinesterasa (AChE) degrada la acetilcolina, esta última actúa como neurotransmisor en el cerebro. Un incremento excesivo en la actividad de AChE está estrechamente relacionado con una falla en la neurotransmisión acetilcolinérgica y degeneración de los circuitos neuronales, lo que se traduce en diversas neuropatologías como el Alzheimer y Parkinson (Sánchez-Chávez y col., 2008; Alpízar-Quesada y Morales-Alpízar, 2003). Por otro lado, se ha observado que un incremento excesivo de la actividad de la enzima prolil-oligopeptidasa (POP) ocasiona procesos inflamatorios a nivel cerebral (Höfling y col., 2016), promoviendo la generación de placas β -amiloide en células de neuroblastoma (Taraszkiwicz y col., 2023). Además, se ha visto que un incremento del estrés oxidativo en el cerebro contribuye con la génesis de Alzheimer y Parkinson (Lara y col., 2015; Lee y col., 2020). Hasta la fecha, son escasas las investigaciones dirigidas a la producción de

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/a: Cian, Raúl



péptidos neuroprotectores a partir de manoproteínas de levadura de cerveza residual. Además, no hay estudios centrados en el estudio de la bioaccesibilidad de estos péptidos luego de un proceso de digestión gastrointestinal simulada seguida de una fermentación colónica.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo fueron obtener péptidos con propiedades neuroprotectoras y antioxidantes a partir de manoproteínas de levaduras residuales de cervecería y evaluar la bioaccesibilidad peptídica luego de una digestión gastrointestinal simulada seguida de una fermentación colónica *in vitro*.

METODOLOGÍA

Las levaduras residuales fueron proporcionadas por una cervecería artesanal de Santa Fe. Luego, las levaduras fueron tratadas térmicamente y al residuo obtenido se le adicionó la enzima β -glucanasa de acuerdo a Aquino y col. (2024). Posteriormente, el residuo de hidrólisis obtenido con β -glucanasa se utilizó como sustrato para producir los péptidos bioactivos. Para ello, se utilizaron dos sistemas enzimáticos: Alcalasa (A) y Alcalasa + Flavourzyme (A+F). El proceso de hidrólisis se llevó a cabo según Cian y col. (2018). Luego, los hidrolizados fueron sometidos a un proceso de digestión gastrointestinal simulada (DGIS) seguida de una fermentación colónica (FC) (Aquino y col., 2024). A partir de la etapa gastrointestinal se obtuvieron dos dializados (DA y DA+F). Así mismo, luego de la fermentación colónica se obtuvieron los dializados DFA y DFA+F. A cada una de las muestras se les determinó el contenido de proteínas según Lowry y col. (1951) y se les evaluó las propiedades antioxidantes mediante FRAP siguiendo el método de Cian y col., (2021). A todas las muestras se les evaluaron las actividades neuroprotectoras mediante la inhibición de las enzimas tirosinasa (EC1.14.18.1), acetilcolinesterasa (AChE) (EC: 3.1.1.7) y prolil-oligopeptidasa (POP) según Takahashi y col. (2012), Spontón y col. (2016) y Chanajon y col. (2022), respectivamente. Todas las bioactividades se evaluaron por triplicado. Se realizó el test de ANOVA para determinar diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$) y el test de LSD (*Least Significant Difference*) para comparación de a pares al 95% de confianza, utilizando el Software Statgraphics Centurion XV.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

El hidrolizado A+F presentó mayor poder reductor que A, siendo los valores de FRAP $0,24 \pm 0,00$ y $0,19 \pm 0,00$ mmol de Trolox/L, respectivamente. Al respecto, Jin y col., (2016) encontraron que la combinación de las enzimas Alcalasa y Flavourzyme genera péptidos con mayor actividad antioxidante que los productos obtenidos con dichas enzimas de forma individual. La DGIS modificó la actividad antioxidante de los hidrolizados. En este sentido, se pudo observar un incremento del potencial antioxidante para A, siendo el valor de FRAP para DA de $0,22 \pm 0,01$ mmol Trolox/L. Sin embargo, para A+F se observó una reducción del poder reductor tras el proceso digestivo, siendo el valor de DA+F de $0,15 \pm 0,00$ mmol Trolox/L. Por lo tanto, la DGIS promovió la formación de nuevos péptidos a partir de A con mayor potencial antioxidante. Por el contrario, luego de la FC, el dializado con mayor poder reductor fue DFA+F ($0,30 \pm 0,01$ mmol de Trolox/L). Esto indica que las proteasas microbianas modulan la generación de péptidos antioxidantes, los cuales resultan bio-accesibles.

Respecto a las propiedades neuroprotectoras, el hidrolizado A+F exhibió mayor inhibición frente a la enzima POP que A (**Tabla 1**). Además, se pudo observar que la DGIS promovió la generación de nuevos péptidos a partir de A+F con mayor actividad inhibidora frente a esta enzima. Sin

embargo, la IC₅₀ de DFA+F fue mayor a la obtenida en DA+F. Esto indicaría que los péptidos que dializan a nivel colónico poseen menor poder inhibitorio frente a POP. Son escasos los estudios que existen en la actualidad sobre el efecto de la DGIS y FC sobre la inhibición de esta enzima. Al igual que para POP, el hidrolizado A+F exhibió mayor inhibición frente a la enzima tirosinasa que A (**Tabla 1**). Además, se pudo observar que la DGIS promovió la generación de nuevos péptidos a partir de A+F con mayor actividad inhibitoria frente a esta enzima. En este sentido, se ha reportado que la DGIS favorece la generación de péptidos inhibidores de tirosinasa (Feng y col., 2021). No obstante, el potencial inhibitorio de los dializados colónicos fue menor al encontrado para los dializados gastrointestinales (mayor IC₅₀).

Tabla 1 Inhibición con las enzimas POP, Tirosinasa-Monofenolasa y AChE mediante el cálculo de IC₅₀

Muestras	IC ₅₀ POP (mg/ml proteínas)	IC ₅₀ Tirosinasa-Monofenolasa (mg/ml proteínas)	IC ₅₀ AChE (mg/ml proteínas)
A	3,59 ± 0,00 ^f	16,90 ± 0,10 ^f	NA
A+F	2,86 ± 0,00 ^e	9,21 ± 0,00 ^e	NA
DA	0,922 ± 0,069 ^b	0,98 ± 0,1 ^b	1,53 ± 0,00 ^c
DA+F	0,68 ± 0,00 ^a	0,45 ± 0,00 ^a	NA
DFA	1,28 ± 0,00 ^c	2,27 ± 0,00 ^c	0,71 ± 0,00 ^b
DFA+F	2,22 ± 0,19 ^d	4,09 ± 0,00 ^d	0,35 ± 0,00 ^a

NA: No activo. Valores con diferentes letras en una misma columna presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a la inhibición de la enzima AChE, ninguno de los hidrolizados presentó actividad (**Tabla 1**). Sin embargo, luego de la DGIS de A se generaron péptidos inhibidores de dicha enzima, los cuales resultaron bioaccesibles a nivel gastrointestinal. Resulta importante destacar que la FC promovió la producción de péptidos inhibidores de AChE a partir de ambos hidrolizados. Además, DFA+F exhibió mayor actividad que DFA, obteniéndose el menor valor de IC₅₀ entre todas las muestras analizadas.

Las levaduras residuales de cervecera resultaron ser un buen sustrato para obtener péptidos con propiedades neuroprotectoras y antioxidantes. Además, el proceso de digestión gastrointestinal simulada seguido de una fermentación colónica moduló dichas bioactividades, observándose incrementos o reducciones de las actividades en los dializados. Así mismo, el dializado gastrointestinal obtenido a partir A+F presentó las mayores propiedades neuroprotectoras (inhibición de POP y tirosinasa), mientras que su dializado colónico exhibió el mayor potencial reductor e inhibición de AChE. Por lo tanto, la hidrólisis de manoproteínas con Alcalasa y Flavourzyme permite generar péptidos neuroprotectores y antioxidantes, los cuales son precursores de nuevas especies más activas y bioaccesibles que se generan por las proteasas digestivas y microbianas.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Alpizar-Quesada, C., y Morales-Alpizar, C.** 2003. La enfermedad de Alzheimer y los inhibidores de la colinesterasa. *Acta Médica Costarricense*, 45 (2), 50-56.
- Aquino, M., Sánchez de Medina, F., Drago, S., Martínez-Augustín, O., Cian, R.** 2024. Gastrointestinal digestion and colonic fermentation of brewer's spent yeast peptides modulate their antioxidant properties and effect on intestinal barrier. *Food Bioscience*, 104294.

- Chanajon, P., Noisa, P., Yongsawatdigul, J.** 2022. Prolyl oligopeptidase inhibition and cellular antioxidant activities of a corn gluten meal hydrolysate. *Cereal Chemistry*, 99(6), 1183-1195.
- Cian, R. E., Garzón, A. G., Martínez-Augustín, O., Botto, 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(4), 241-246.
- Cian, R. E., Salgado, P., Mauri, A., y Drago, S.** 2021. High iron bioaccessibility from co-microencapsulated iron/ascorbic acid using chelating polypeptides from brewers' spent grain protein as wall material. *International Journal of Food Science y Technology*, 55(5), 1311-1317.
- Feng, Y., Wang, Z., Chen, J., Li, H., Wang, Y., Ren, D., y Lu, J.** 2021. Tyrosinase inhibitory peptides from defatted walnut meal hydrolysates: Separation, identification, and molecular docking. *Food Chemistry*, 353, 129471.
- Höfling.** 2016. Deficiency of prolyl oligopeptidase in mice disturbs synaptic plasticity and reduces anxiety-like behaviour, body weight, and brain volume. *European Neuropsychopharmacology. The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 26, 1048–1061.
- Jin, D.-X., Liu, X.-L., Zheng, X.-Q., Wang, X.-J., & He, J.-F.** 2016. Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. *Food Chemistry*, 204, 427-436.
- Lara, H., Alanía-Garza, E., Estrada Puente, M., Mureyko, L., Alarcón Torres, D., y Turrent, L.** 2015. Nutrición que previene el estrés oxidativo causante del Alzheimer. *Prevención del Alzheimer. Gaceta Médica de México*, 151, 245-251.
- Lee, K. H., Cha, M. y Lee, B. H.** 2020. Neuroprotective effect of antioxidants in the brain. *International journal of molecular sciences* 21(19): 7152.
- 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., Sedman, J., y Ismail, A.** 2020. Characterization of the structural properties of mannoproteins isolated from selected yeast-based products upon the enzymatic treatment. *Food Science and Technology*, 131:109596.
- Li, Q., Mo, J., Xiong, B., Liao, Q., Chen, Y., Wang, Y., ... & Sun, H.** 2021. Discovery of resorcinol-based polycyclic structures as tyrosinase inhibitors for treatment of Parkinson's disease. *ACS Chemical Neuroscience*, 13(1), 81-96..
- Lowry, H., Rosebrough, N., Farr, A., y Randall, R.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Marson, G.V., de Castro, R.J.S., Belleville, MP.** (2020a). Spent brewer's yeast as a source of high added value molecules: a systematic review on its characteristics, processing and potential applications. *World J Microbiol Biotechnol* 36, 95.
- Sánchez-Chávez, G., & Salceda, R.** (2008). Enzimas polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(2), 44-51.
- Spontón, P., Spinelli, R., Drago, S., Tonarelli, G., y Simonetta, A.** 2016. Acetylcholinesterase-inhibitor hydrolysates obtained from 'in vitro' enzymatic hydrolysis of mannoproteins extracted from different strains of yeasts. *International Journal of Food Science y Technology*, 51(2), 300-308.
- Taraszkiewicz, A., Sinkiewicz, I., Sommer, A., y Staroszczyk, H.** 2023. The biological role of prolyl oligopeptidase and the procognitive potential of its peptidic inhibitors from food proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 16, 1-14.
- 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
- of *Food Composition and Analysis*, 52, 44-51.
- Yang, X., Choi, H. S., Park, C., y Kim, S. W.** 2015. Current states and prospects of organic waste utilization for biorefineries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 49, 335-349.