

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis presentada para acceder al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas

## **PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE ORIGEN MICROBIANO DE INTERÉS PARA EL DESARROLLO DE ALIMENTOS FUNCIONALES**

Lic. Pablo Gabriel Spontón

Director: Dr. Arturo Simonetta

Co-Directora: Dra. Georgina Tonarelli

Laboratorio de Péptidos Bioactivos, Dto. de Química Orgánica, FBCB-UNL.

Cátedras de Microbiología y Biotecnología, Dto. de Ingeniería en Alimentos, FIQ-UNL.

**-2016-**

## **AGRADECIMIENTOS**

---

La presente Tesis se llevó a cabo en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, y en las Cátedras de Microbiología y Biotecnología del Departamento de Ingeniería en Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química, pertenecientes a la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, bajo la dirección del Dr. Arturo C. Simonetta y de la Dra. Georgina G. Tonarelli.

Quiero agradecer a todos lo que han colaborado en la realización de este trabajo:

En primer lugar agradezco a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y a la Universidad Nacional del Litoral por haberme dado el espacio para desarrollarme como profesional, tanto en el doctorado como en mi carrera de grado.

A CONICET por haberme otorgado las becas de postgrado para poder realizar el doctorado.

A mi Director Arturo y a mi Co-Directora Georgina, realmente gracias por todo. He aprendido mucho de ustedes a lo largo de todos estos años y lo sigo haciendo cada día. Son grandes persona a la cuales aprecio muchísimo. Gracias por su ayuda y consejos tanto profesionales como de vida y por confiar en mí.

A mis compañeros de Orgánica Roke, Álvaro, Meli, Verito, Nati e Iván por su ayuda, predisposición, consejos, alegría y principalmente por su amistad.

A todos mis compañeros tanto del departamento de Química Orgánica como de las Cátedras de Microbiología y Biotecnología por tener muy buena predisposición y acompañarme durante todos estos años.

A la Dra. Silvina Drago y al Dr. Raúl Sian del Instituto de Tecnología de Alimentos, FIQ-UNL, por su colaboración en el análisis de inhibición de ECA y en la determinación del grado de hidrólisis.

A la Dra. Alicia Couto y a la Dra. Malena Landoni del Centro de Investigaciones en Hidratos de Carbono (CIHIDECAR), CONICET-UBA quienes gentilmente colaboraron para llevar a cabo los análisis de carbohidratos por cromatografía HPAEC-PAD.

A las Dras. Eliandre de Oliveira y Antonia Odena de la Plataforma de Proteómica, Parc Científic de Barcelona, España, por llevar a cabo los análisis por Espectrometría de Masas en su Institución.

A Ceci, por ser una gran Amiga. Gracias por todas las charlas, por escucharme, aconsejarme siempre y por todos los momentos compartidos. Sos una gran persona.

A mis Amigos-Hermanos de la vida: Marce, Franco, Adrián, Facu, Fabio, Fabi, René, Rodri, Marcos, Germán por estar siempre y por cada momento compartido, y a vos Chipó también que desde arriba nos guías y ayudas en todo... Se te extraña amigo! Sin ustedes realmente no sería la persona que soy hoy en día... GRACIAS

A PAPÁ y a MAMÁ. Simplemente los AMO. Realmente gracias por todo. Ustedes tienen mucho que ver con todo lo que he logrado. Gracias por estar siempre, por ayudarme, cuidarme, aconsejarme y brindarme todo su apoyo y amor! GRACIAS

A mis hermanos PIKI, GI y PAO y a los hermosos sobrinos que me han dado, Giané, Simón, Gere, Liz y Lourdes... Gracias por estar siempre. Los AMO a todos. También a mis cuñados Aynelen, Gabriel y Fernando, grandes personas a las que les tengo un gran aprecio.

Y a todos los que estuvieron a mi lado en algún momento de mi vida y me ayudaron y me brindaron lo mejor de cada uno, permitiéndome ser hoy la persona que soy.

A TODOS MUCHAS GRACIAS DE CORAZÓN...

## PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

---

### Trabajos publicados

**2016.** Spontón, P. G.; Spinelli, R.; Drago, S. R.; Tonarelli, G. G. y Simonetta, A. C. *Acetylcholinesterase-inhibitor hydrolysates obtained from “in vitro” enzymatic hydrolysis of mannoproteins extracted from different strains of yeasts.* International Journal of Food Science and Technology, 51: 300 - 308. doi:10.1111/ijfs.12940.

### Trabajos presentados en reuniones científicas

**Noviembre 2011.** SIMPOSIO NACIONAL DE QUÍMICA ORGÁNICA (SINAQO). Presentación de poster: “Obtención de manoproteínas de distintas especies de levaduras y sus potenciales aplicaciones en la generación de péptidos bioactivos”. Pablo Spontón, Georgina Tonarelli, Arturo Simonetta. 13 al 16 de noviembre de 2011, Carlos Paz, Córdoba, Argentina.

**Noviembre 2011.** SIMPOSIO NACIONAL DE QUÍMICA ORGÁNICA (SINAQO). Presentación de poster: “Diseño de lipopéptidos y oligómeros con secuencias cortas como antimicrobianos”. Verónica Húmpola, Pablo Spontón, Carolina Rey, Arturo Simonetta, Georgina Tonarelli. 13 al 16 de noviembre de 2011, Carlos Paz, Córdoba, Argentina.

**Octubre 2012.** XXIX CONGRESO ARGENTINO DE QUÍMICA. CENTENARIO DE LA ASOCIACIÓN QUÍMICA ARGENTINA. Presentación de poster: MANOPROTEÍNAS AISLADAS DE DIFERENTES ESPECIES DE LEVADURAS COMO NUEVAS FUENTES DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS. Pablo Spontón, Georgina Tonarelli, Arturo Simonetta; 2 al 5 de octubre de 2012, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

**Noviembre 2012.** XI CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGÍA E HIGIENE DE ALIMENTOS. IV CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS. III SIMPOSIO ARGENTINO DE CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS. Presentación de poster: PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS A PARTIR DE MANOPROTEÍNAS AISLADAS DE DIFERENTES CEPAS DE LEVADURAS. Pablo Spontón, Georgina Tonarelli,

Arturo Simonetta; 26 al 29 de noviembre de 2012, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

**Septiembre 2013.** XIII CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA 2013. Presentación de poster: PRODUCCIÓN DE EXTRACTOS PEPTÍDICOS CON ACTIVIDAD INHIBITORIA FRENTE A LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA IN VITRO DE MANOPROTEÍNAS DE LEVADURAS. -Pablo Spontón, Roque Spinelli, Georgina Tonarelli, Arturo Simonetta; 23 al 26 de septiembre de 2013, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Octubre 2014.** International conference on food Innovation – FoodInnova 2014. Presentación de poster: PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS A PARTIR DE MANOPROTEÍNAS AISLADAS DE DIFERENTES ESPECIES DE LEVADURAS. Pablo Spontón, Roque Spinelli, Georgina Tonarelli, Arturo Simonetta; 20 al 23 de octubre de 2014, ciudad de Concordia, Entre Ríos, Argentina.

**Agosto 2015.** III Congreso Internacional del Litoral. XVI Jornadas Argentinas de Microbiología. Presentación de poster: FRACCIONAMIENTO Y ANÁLISIS DE HIDROLIZADOS DE MANOPROTEÍNAS ACTIVOS FRENTE A LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA. Pablo Spontón, Silvina Drago, Malena Landomi, Alicia Couto, Georgina Tonarelli, Arturo Simonetta; 5 al 7 de agosto de 2015, ciudad de Santa Fe, Santa Fe, Argentina.

**Noviembre 2015.** XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. INHIBICIÓN DE SISTEMAS ENZIMÁTICOS POR PÉPTIDOS NATURALES DE INTERÉS PARA ALIMENTOS FUNCIONALES. María Florencia Etienot, Karen Russell-White, Pablo Gabriel Spontón, Marta Carrasco, Arturo Carlos Simonetta; 3 al 5 de Noviembre de 2015, Buenos Aires, Argentina.



# ÍNDICE

## INDICE GENERAL

---

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>XIX</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>Alimentos funcionales.....</b>	<b>11</b>
Péptidos bioactivos.....	13
<b>Manoproteínas de levadura.....</b>	<b>15</b>
Levaduras.....	15
Aplicaciones de las levaduras.....	19
<i>Aplicaciones tecnológicas e industriales de las manoproteínas.....</i>	20
<i>Propiedades enológicas de las manoproteínas de las levaduras.....</i>	20
<i>Características bioemulsificantes.....</i>	21
<i>Las manoproteínas como potenciales nutraceuticos.....</i>	21
<i>Efectos sobre enteropatógenos.....</i>	22
<i>Efectos sobre el sistema inmunológico.....</i>	23
<i>Efectos sobre la salud intestinal.....</i>	23
<i>Acción de las manoproteínas sobre las micotoxinas.....</i>	24
<b>Proteínas de la leche.....</b>	<b>25</b>
Composición proteica de la leche.....	25
Proteínas de suero.....	25
Caseína.....	25
Proteínas lácteas como fuente de ingredientes funcionales.....	26
Leches fermentadas como alimentos funcionales.....	27
Actividades biológicas de los péptidos lácteos.....	30
<i>Actividad opiácea.....</i>	30

<i>Actividad antitrombótica.....</i>	31
<i>Actividad inmunomoduladora.....</i>	32
<i>Actividad antimicrobiana.....</i>	33
<i>Péptidos quelantes de minerales.....</i>	34
<i>Actividad antihipertensiva.....</i>	35
<b>Hipertensión y su relación con la enzima convertidora de angiotensina.....</b>	<b>37</b>
<b>Enfermedad de Alzheimer. Papel de la enzima acetilcolinesterasa...</b>	<b>41</b>
<b>Enfermedades de transmisión alimentaria.....</b>	<b>45</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
<b>Objetivos generales.....</b>	<b>49</b>
<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>49</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>
<b>Microorganismos.....</b>	<b>51</b>
Levaduras.....	51
Bacterias ácido lácticas.....	51
Conservación de los microorganismos.....	51
<b>Hidrolizados de proteínas (HP) a partir de cultivos de cepas de levaduras y de BAL en caseína y en el sustrato comercial (hidrolizado caseínico) NZ-Case Plus.....</b>	<b>53</b>
Soluciones de Caseína.....	53
Soluciones del sustrato comercial NZ-Case Plus.....	53
Cultivos de levaduras en caseína y en el sustrato comercial NZ-Case Plus.....	53
Cultivos de bacterias ácido lácticas en caseína y en el sustrato comercial NZ-Case Plus.....	54
Procedimiento de obtención de los hidrolizados proteicos.....	54
<b>Extractos peptídicos de manoproteínas.....</b>	<b>55</b>



Extracción térmica de manoproteínas.....	55
Purificación de las manoproteínas por cromatografía de afinidad.....	55
<i>Procedimiento</i> .....	56
Diálisis.....	56
<i>Procedimiento</i> .....	57
Digestión enzimática de manoproteínas.....	57
<i>Enzimas utilizadas</i> .....	57
<i>Procedimiento</i> .....	58
<b>Caracterización primaria de los hidrolizados de manoproteínas y de los hidrolizados proteicos (HP) de levaduras y de BAL.....</b>	<b>59</b>
Determinación del contenido de proteínas: Método del ácido bicinconínico.....	59
<i>Procedimiento</i> .....	61
Determinación del Grado de Hidrólisis.....	62
<i>Preparación del reactivo de color</i> .....	62
<i>Preparación de la curva estándar</i> .....	63
<i>Procedimiento</i> .....	63
<i>Determinación de mEq totales</i> .....	64
Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.....	64
<i>Preparación de las muestras y siembra en los geles ya         armados</i> .....	65
<i>Condiciones de las determinaciones electroforéticas</i> .....	66
<i>Método de tinción con plata</i> .....	67
<i>Método de tinción empleando el colorante Coomassie Blue R-250</i> .....	68
<i>Procedimiento</i> .....	68
<b>Medida de la actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa.....</b>	<b>69</b>

<i>Método 1: Screening preliminar de todos los hidrolizados de manoproteínas.....</i>	70
<i>Método 2: Determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI50) de los extractos más activos.....</i>	71
<b>Medida de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina.....</b>	<b>72</b>
<i>Extracción de ECA.....</i>	72
<i>Ensayo de inhibición de la ECA.....</i>	73
<b>Determinación de la actividad antimicrobiana.....</b>	<b>74</b>
Ensayo de difusión en agar.....	74
Determinación del modo de acción.....	75
<b>Caracterización final de los hidrolizados de manoproteínas biológicamente activos.....</b>	<b>75</b>
Cromatografía en fase reversa.....	75
Cromatografía líquida en fase reversa utilizando cartuchos Sep-Pak C18 Plus en tandém.....	76
<i>Procedimiento.....</i>	76
Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).....	77
Análisis por Espectrometría de Masas MALDI-TOF.....	77
<i>Procedimiento.....</i>	77
Análisis por Cromatografía de Alto Rendimiento de Intercambio Aniónico con Detección Amperométrica Pulsada.....	78
<i>Procedimiento.....</i>	79
<i>Hidrólisis.....</i>	79
<i>Análisis de azúcares por HPAEC-PAD.....</i>	79
Cromatografía Líquida acoplada a Electrospray y Espectrometría de Masas en tandém.....	79

<b>CAPÍTULO I: Manoproteínas de levaduras como fuente de péptidos y glicopéptidos biológicamente activos.....</b>	<b>81</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>82</b>
<b>Extracción térmica de manoproteínas. Purificación por cromatografía de afinidad y diálisis.....</b>	<b>83</b>
<b>Análisis por SDS-PAGE.....</b>	<b>87</b>
<b>Determinación del Grado de Hidrólisis.....</b>	<b>92</b>
<b>Screening de la actividad inhibitoria frente a la enzima convertidora de angiotensina.....</b>	<b>95</b>
<b>Ensayo de actividad antimicrobiana.....</b>	<b>98</b>
Ensayo de actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram (+) y Gram (-).....	98
Determinación del modo de acción.....	100
<i>Cinética de crecimiento de Bacillus cereus DBFIQ B 28.....</i>	101
<i>Cinética de crecimiento de Listeria monocytogenes tipo I DTUNLu 328.....</i>	103
<b>Determinación de la actividad inhibitoria frente a la enzima acetilcolinesterasa.....</b>	<b>105</b>
<b>Fraccionamiento de los extractos más activos frente a AChE por cromatografía en fase reversa y determinación de la actividad inhibitoria.....</b>	<b>111</b>
<b>Análisis de las fracciones más activas por HPLC, HPAEC-PAD y Espectrometría de Masas MALDI-TOF.....</b>	<b>113</b>
Fracción del extracto de manoproteínas de <i>Candida blankii</i> LTW7 hidrolizado con tripsina, eluido al 15 % (v/v) de acetonitrilo.....	113
Fracción del extracto de manoproteínas de <i>Candida blankii</i> LTW7 hidrolizado con tripsina/quimotripsina, eluido al 15 % de acetonitrilo.....	116
Fracción del extracto de manoproteínas de <i>Candida blankii</i> LTW7 hidrolizado con pepsina/quimotripsina eluido al 15 % (v/v) de	

acetónitrilo.....	118
Fracción del extracto de manoproteínas de <i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2 hidrolizado con proteinasa K eluido al 15 % (v/v) de acetónitrilo.....	120
Fracción del extracto de manoproteínas de <i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2 hidrolizado con pepsina/quimotripsina, eluido al 15 (v/v) % de acetónitrilo.....	122
Fracción del extracto de manoproteínas de <i>P. anomala</i> LTW6 hidrolizado con pepsina/quimotripsina, eluido al 2 % (v/v) de acetónitrilo.....	124
<b>Análisis por Cromatografía de Alto Rendimiento de Intercambio Aniónico con Detección Amperométrica Pulsada.....</b>	<b>126</b>
<b>Separación por cromatografía de afinidad, empleando Concanavalina A, de las fracciones más activas frente a AChE y determinación de la actividad inhibitoria.....</b>	<b>127</b>
<b>Análisis peptidómico por Espectrometría de Masas de las fracciones peptídicas activas frente a la enzima acetilcolinesterasa.....</b>	<b>128</b>
<b>CONCLUSIONES PARCIALES: CAPÍTULO I.....</b>	<b>139</b>
<b>CAPÍTULO II: Proteólisis microbiana sobre compuestos caseínicos para generar péptidos bioactivos.....</b>	<b>143</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>144</b>
<b>Obtención de hidrolizados de proteínas (HP) a partir de cultivos de cepas de levaduras y de BAL en caseína y en el sustrato comercial NZ-Case Plus.....</b>	<b>145</b>
<b>Determinación del Grado de Hidrólisis.....</b>	<b>148</b>
<b>Determinación de la actividad inhibitoria frente a la enzima acetilcolinesterasa.....</b>	<b>153</b>
<b>Determinación de la actividad inhibitoria frente a la enzima convertidora de angiotensina.....</b>	<b>157</b>
<b>Ensayo de actividad antimicrobiana.....</b>	<b>162</b>

<b>CONCLUSIONES PARCIALES: CAPÍTULO II.....</b>	<b>166</b>
<b>CONCLUSIONES FINALES.....</b>	<b>168</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>173</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1:</b> Péptidos bioactivos y sus efectos saludables.....	13
<b>Tabla 2:</b> Composición del caldo YM.....	52
<b>Tabla 3:</b> Composición de los reactivos utilizados en el método del ABC...	61
<b>Tabla 4:</b> Curva de calibrado para grupos amino libres.....	63
<b>Tabla 5:</b> Formulación de los geles.....	67
<b>Tabla 6:</b> Composición de los reactivos utilizados en el ensayo de inhibición de la ECA.....	73
<b>Tabla 7:</b> Rendimiento de la manoproteínas extraídas de las 5 cepas de levaduras en estudio.....	83
<b>Tabla 8:</b> Determinación del grado de hidrólisis de las distintas manoproteínas sometidas a diferentes tratamientos enzimáticos.....	94
<b>Tabla 9:</b> Actividad inhibitoria frente a ECA de todos los hidrolizados de manoproteínas.....	96
<b>Tabla 10:</b> Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidrolizados de manoproteínas frente a <i>L. monocytogenes</i> tipo I DTUNLu 328.....	99
<b>Tabla 11:</b> Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidrolizados de manoproteínas frente a <i>Bacillus cereus</i> DBFIQ B 28.....	100
<b>Tabla 12:</b> Conteo de células viables por el método de diluciones sucesivas y siembra en placas de Petri.....	101
<b>Tabla 13:</b> Conteo de células viables por el método de diluciones sucesivas y siembra en placas de Petri.....	103
<b>Tabla 14:</b> Screening de la actividad inhibitoria frente a AChE de los hidrolizados de manoproteínas con tripsina y tripsina/quimotripsina....	106
<b>Tabla 15:</b> Screening de la actividad inhibitoria frente a AChE de los hidrolizados de manoproteínas con pepsina y pepsina/quimotripsina....	107
<b>Tabla 16:</b> Screening de la actividad inhibitoria frente a AChE de los hidrolizados de manoproteínas con proteinasa K y proteinasa K/quimotripsina.....	109

<b>Tabla 17:</b> Valores de CI50 de la actividad inhibitoria frente a AChE.....	110
<b>Tabla 18:</b> Actividad inhibitoria frente a AChE de las fracciones obtenidas por cromatografía en fase reversa.....	112
<b>Tabla 19:</b> Determinación de presencia/ausencia de carbohidratos.....	126
<b>Tabla 20:</b> Actividad inhibitoria frente a AChE de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad.....	127
<b>Tabla 21:</b> Secuencias obtenidas de la fracción peptídica de <i>C. blankii</i> LTW7 hidrolizada con tripsina.....	129
<b>Tabla 22:</b> Secuencias obtenidas de la fracción peptídica de <i>C. blankii</i> LTW7 hidrolizada con tripsina/quimotripsina.....	131
<b>Tabla 23:</b> Secuencias obtenidas de la fracción peptídica de <i>C. blankii</i> LTW7 hidrolizada con pepsina/quimotripsina.....	132
<b>Tabla 24:</b> Secuencias obtenidas de la fracción peptídica de <i>C. blankii</i> LTW7 hidrolizada con proteinasa K.....	133
<b>Tabla 25:</b> Secuencias obtenidas de la fracción peptídica de <i>S. cerevisiae</i> LBFIQ L2 hidrolizada con pepsina/quimotripsina.....	134
<b>Tabla 26:</b> Secuencias obtenidas de la fracción peptídica de <i>P. anomala</i> LTW6 hidrolizada con pepsina/quimotripsina.....	135
<b>Tabla 27:</b> Concentración proteica y pH final de los diferentes hidrolizados proteicos (HP) obtenidos con caseína y NZ-Case Plus al 1 %.	147
<b>Tabla 28:</b> Determinación del grado de hidrólisis para los diferentes hidrolizados proteicos (HP) obtenidos de caseína y del sustrato comercial NZ-Case Plus.....	149
<b>Tabla 29:</b> Actividad inhibitoria frente a AChE de los hidrolizados proteicos obtenidos a partir de caseína.....	155
<b>Tabla 30:</b> Actividad inhibitoria frente a AChE de los hidrolizados proteicos obtenidos a partir NZ-Case Plus.....	156
<b>Tabla 31:</b> Actividad inhibitoria frente a ECA de todos los hidrolizados de caseína.....	158
<b>Tabla 32:</b> Actividad inhibitoria frente a ECA de todos los hidrolizados de NZ-Case Plus.....	159

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1:</b> Envoltura externa de las levaduras.....	16
<b>Figura 2:</b> Patrones de glicosilación de manoproteínas.....	18
<b>Figura 3:</b> Sistema proteolítico de <i>Lactococcus lactis</i> .....	30
<b>Figura 4:</b> Sistemas renina-angiotensina y quinina-caliceína. Acción de la enzima convertidora de angiotensina.....	39
<b>Figura 5:</b> Inhibidores de acetilcolinesterasa (AChE) en la transmisión colinérgica nerviosa.....	43
<b>Figura 6:</b> Estructura del ácido bicinconínico.....	59
<b>Figura 7:</b> Fundamento del método del ácido bicinconínico para la determinación del contenido de proteínas.....	60
<b>Figura 8:</b> Reacción de OPA con una amina primaria en presencia de un tiol.....	62
<b>Figura 9:</b> Esquema de la reacción enzimática en que se basa el método colorimétrico para determinar la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa.....	70
<b>Figura 10:</b> Perfiles de elución por cromatografía de afinidad para cada extracto de manoproteínas.....	86
<b>Figuras 11 y 12:</b> Resultados de los análisis por SDS-PAGE (porcentaje del gel de separación: 16 %) de cada uno de los 5 extractos sin purificar y purificados.....	87
<b>Figura 13:</b> Resultados de SDS-PAGE (porcentaje de gel de separación: 16 %) para los hidrolizados con distintas proteasas de las manoproteínas de la cepa <i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2.....	89
<b>Figura 14:</b> Resultados de SDS-PAGE (porcentaje de gel de separación: 16 %) para los hidrolizados con distintas proteasas de las manoproteínas de la cepa <i>C. famata</i> DBFIQ L17.....	90
<b>Figura 15:</b> Resultados de SDS-PAGE (porcentaje de gel de separación: 16 %) para los hidrolizados con distintas proteasas de las manoproteínas de la cepa <i>B. intermedius</i> DBFIQ L12.....	90



<b>Figura 16:</b> Resultados de SDS-PAGE (porcentaje de gel de separación: 16 %) para los hidrolizados con distintas proteasas de las manoproteínas de la cepa <i>C. blankii</i> LTW7.....	91
<b>Figura 17:</b> Resultados de SDS-PAGE (porcentaje de gel de separación: 16 %) para los hidrolizados con distintas proteasas de las manoproteínas de la cepa <i>P. anomala</i> LTW6.....	92
<b>Figura 18:</b> Efecto del extracto de manoproteína de <i>C. blankii</i> LTW7 hidrolizado con tripsina sobre el crecimiento de <i>B. cereus</i> DBFIQ B 28....	102
<b>Figura 19:</b> Efecto del extracto de manoproteína de <i>P. anomala</i> LTW6 hidrolizado con tripsina en el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> tipo I DTUNLu 328.....	104
<b>Figura 20:</b> Perfil cromatográfico de HPLC en fase reversa de la fracción obtenida utilizando cartuchos Sep Pack C18, eluida con ACN al 15 % (v/v), del extracto de <i>C. blankii</i> LTW7 hidrolizado con tripsina.....	114
<b>Figura 21:</b> Espectro de Masas de MALDI-TOF de la fracción eluida al 15 % de ACN del extracto de <i>C. blankii</i> LTW7 hidrolizado con tripsina.....	115
<b>Figura 22:</b> Perfil cromatográfico de HPLC en fase reversa de la fracción obtenida utilizando cartuchos Sep Pack C18, eluida con ACN al 15 % (v/v), del extracto <i>C. blankii</i> LTW7 hidrolizado con tripsina/quimotripsina.....	116
<b>Figura 23:</b> Espectro de Masas de MALDI-TOF de la fracción eluida al 15 % de ACN del extracto de <i>C. blankii</i> LTW7 hidrolizado con tripsina/quimotripsina.....	117
<b>Figura 24:</b> Perfil cromatográfico de HPLC en fase reversa de la fracción obtenida utilizando cartuchos Sep Pack C18, eluida con ACN al 15 % (v/v), del extracto <i>C. blankii</i> LTW7 hidrolizado con pepsina/quimotripsina.....	118
<b>Figura 25:</b> Espectro de Masas de MALDI-TOF de la fracción eluida al 15 % de ACN del extracto de <i>C. blankii</i> LTW7 hidrolizado con pepsina/quimotripsina.....	119
<b>Figura 26:</b> Perfil cromatográfico de HPLC en fase reversa de la fracción obtenida utilizando cartuchos Sep Pack C18, eluida con ACN al 15 %	

(v/v), del extracto <i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2 hidrolizado con proteinasa K...	120
<b>Figura 27:</b> Espectro de Masas de MALDI-TOF de la fracción eluida al 15 % de ACN del extracto de <i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2 hidrolizado con proteinasa K.....	121
<b>Figura 28:</b> Perfil cromatográfico de HPLC en fase reversa de la fracción obtenida utilizando cartuchos Sep Pack C18, eluida con ACN al 15 % (v/v), del extracto <i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2 hidrolizado con pepsina/quimotripsina.....	122
<b>Figura 29:</b> Espectro de Masas de MALDI-TOF de la fracción eluida al 15% de ACN del extracto de <i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2 hidrolizado con pepsina/quimotripsina.....	123
<b>Figura 30:</b> Perfil cromatográfico de HPLC en fase reversa de la fracción obtenida utilizando cartuchos Sep Pack C18, eluida al 2 % de ACN (sin retener), del extracto <i>P. anomala</i> LTW6 hidrolizado con pepsina/quimotripsina.....	124
<b>Figura 31:</b> Espectro de Masas de MALDI-TOF de la fracción “sin retener” del extracto de <i>P. anomala</i> LTW6 hidrolizado con pepsina/quimotripsina.....	125
<b>Figura 32:</b> SDS-PAGE (porcentaje de gel de separación: 16 %) de la caseína hidrolizada con las cepas de BAL.....	151
<b>Figura 33:</b> SDS-PAGE (porcentaje de gel de separación: 16 %) de la caseína hidrolizada con las cepas de levaduras.....	152
<b>Figura 34:</b> SDS-PAGE (porcentaje de gel de separación: 16 %) de la caseína hidrolizada con las cepas de levaduras.....	153

## ABREVIATURAS

---

<b>Å:</b> Angstrom	<b>CI50:</b> concentración inhibitoria 50
<b>A: Ala:</b> alanina	<b>cm:</b> centímetro
<b>ABC:</b> ácido bicinconínico	<b>Col:</b> colaboradores
<b>ABE:</b> albúmina bovina estándar	<b>Con A:</b> concanavalina A
<b>AC:</b> antes de cristo	<b>D: Asp:</b> ácido aspártico
<b>AChE:</b> enzima acetilcolinesterasa	<b>Da:</b> Dálton
<b>ACN:</b> acetonitrilo	<b>DTNB:</b> 5,5'-ditiobis-2- nitrobenzoico
<b>ADH:</b> hormona antidiurética	<b>DTPep:</b> di y tripéptidos
<b>ADN:</b> ácido desoxirribonucleico	<b>DTT:</b> ditioneitol
<b>ADP:</b> difosfato de adenosina	<b>DTTPep:</b> di, tri y tetrapéptidos
<b>AEB:</b> actividad enzimática basal	<b>E.C.:</b> enzymatic classification
<b>AEM:</b> actividad enzimática de la muestra	<b>E: Glu:</b> ácido glutámico
<b>AF:</b> ácido fórmico	<b>EA:</b> enfermedad de Alzheimer
<b>ANP:</b> péptido natriurético auricular	<b>ECA:</b> enzima convertidora de angiotensina
<b>APS:</b> persulfato de amonio	<b>EDTA:</b> ácido etilendiaminotetraacético
<b>BAL:</b> bacterias ácido lácticas	<b>ES:</b> enzima + sustrato
<b>BES:</b> blanco de enzima + sustrato	<b>ETAs:</b> enfermedades de transmisión alimentaria
<b>BME:</b> blanco de muestra + enzima	<b>F: Phe:</b> Fenilalanina
<b>BSA:</b> seroalbúmina	<b>FAO:</b> Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>c.s.p.:</b> cantidad suficiente para	<b>FDR:</b> false discovery rate
<b>C: Cys:</b> cisteína	<b>FGP:</b> fracción peptídica
<b>Caldo YM:</b> caldo extracto de malta-extracto de levadura	<b>FP:</b> fracción glicopeptídica
<b>CID:</b> Collision induced Dissociation	<b>FUFOSE:</b> Functional Food Science in Europe

**g:** gramo

**G: Gly:** glicina

**GFN:** Global Foodborne Infections Network

**GH:** grado de hidrólisis

**GRAS:** Generally Regarded As Safe

**h:** hora

**H: His:** Histidina

**HHL:** N-Hipuril-Histidil-Leucina

**HPAEC-PAD:** High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection

**HP:** hidrolizado proteico

**HPLC:** High Performance liquide Chromatographic

**I: Ile:** Isoleucina

**IAC<sub>h</sub>E:** inhibidores de acetilcolinesterasa

**Ig:** inmunoglobulinas

**IgA:** inmunoglobulina A

**IgG:** inmunoglobulina G

**ILSI:** International Life Science Institute

**K: Lys:** lisina

**kDa:** kiloDálton

**L: Leu:** leucina

**l:** litro

**Lf:** lactoferrina

**M: Met:** metionina

**MALDI:** Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

**mEq:** miliequivalente

**MES:** muestra + enzima + sustrato

**mg:** miligramo

**MH<sup>+</sup>:** masa monoisotópica protonada

**min:** minuto

**ml:** mililitro

**m/z:** relación masa/carga del ion

**N: Asn:** asparagina

**N.I.:** No inhibió

**nm:** nanómetro

**Nr:** número de residuos

**OliPep:** oligopéptidos

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OPA:** o-ftaladehído

**P: Pro:** prolina

**PAs:** péptidos antimicrobianos

**PM:** peso molecular

**PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**Prot:** proteinasa

**p/v:** peso en volumen

**Q: Gln:** glutamina

**R: Arg:** arginina

**RTE:** reactivo de trabajo estándar

**S: Ser:** serina

**SD:** standard deviation

**SDS:** sodium dodecyl sulfate

**SDS-PAGE:** sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

**SIDA:** síndrome de inmunodeficiencia adquirida

**SLC:** sobrenadantes libres de células

**T: Thr:** treonina

**TEMED:** N,N,N,N'-tetrametilen-diamina

**TF1:** tampón fosfato 1

**TFA:** ácido trifluoroacético

**TOF:** Time-Of-Flight

**t<sub>r</sub>:** tiempo de retención

**TRIS:** 2-Amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol

**TT:** 2,4,6-tricloro 1,3,5-triazina

**UV:** ultravioleta

**V: Val:** valina

**v/v:** volumen en volumen

**W: trp:** triptófano

**Y: Tyr:** tirosina

**$\alpha$ -La:**  $\alpha$ -lactoalbúmina

**$\alpha_{s1}$ -CN:**  $\alpha_{s1}$ -caseína

**$\alpha_{s2}$ -CN:**  $\alpha_{s2}$ -caseína

**$\beta$ -CN:**  $\beta$ -caseína

**$\beta$ -Lg:**  $\beta$ -lactoglobulina

**$\kappa$ -CN:**  $\kappa$ -caseína

**$\mu$ m:** micrómetro

**$\mu$ mol:** micromol



# **RESUMEN**

**RESUMEN**

---

En la actualidad se asume plenamente que los alimentos, además de desempeñar el papel de nutrientes, pueden aportar compuestos bioactivos para el organismo humano, proporcionar beneficios para la salud y reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades. Investigaciones realizadas relativas al diseño y a la elaboración de alimentos funcionales han dedicado especial atención al estudio del papel fisiológico de las proteínas de la dieta. Péptidos bioactivos encriptados en las estructuras de dichas proteínas se generan usualmente *in vivo* por acción de enzimas gastrointestinales, o pueden también obtenerse *in vitro* con enzimas específicas, y/o producirse durante los procesos biotecnológicos de elaboración de determinados alimentos. Los péptidos bioactivos pueden ejercer su efecto sobre los sistemas cardiovascular, digestivo, inmunológico y/o nervioso.

En este trabajo se propuso estudiar y evaluar *in vitro* la actividad inhibitoria frente a la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y a la enzima convertidora de angiotensina (ECA), así como la actividad antimicrobiana, tanto de hidrolizados de manoproteínas obtenidos por hidrólisis enzimática como de hidrolizados proteicos obtenidos de cultivos de bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras en soluciones de caseínas y del producto (hidrolizado) comercial NZ-Case Plus. Además, los objetivos del trabajo también incluyeron fraccionar y caracterizar los hidrolizados que hayan presentado las propiedades bioactivas más interesantes.

*Extractos manoproteínicos*

Se obtuvieron 5 extractos de manoproteínas desde 5 cepas de levaduras por extracción térmica y posterior separación con Concanavalina A y diálisis. Cada extracto se hidrolizó con las enzimas comerciales tripsina, pepsina, proteinasa K y quimotripsina. La capacidad proteolítica sobre cada extracto de manoproteína se confirmó a través de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y por determinación del grado de hidrólisis.

La actividad inhibitoria de todos los extractos hidrolizados de manoproteínas frente a ECA fue nula o baja, con un valor máximo de actividad de 19,7 %

para el extracto de *Saccharomyces cerevisiae* LBFIQ 12 hidrolizado con pepsina/quimotripsina.

La actividad antimicrobiana se determinó frente a bacterias Gram (+) y Gram (-). Sólo se observó inhibición frente a las cepas de *Listeria monocytogenes* tipo I DTUNLu 328 y *Bacillus cereus* DBFIQ B 28. Frente a la cepa de *Listeria* se encontró inhibición por parte del extracto de manoproteína de *Pichia anomala* LTW6 hidrolizado con tripsina, así como también de otros extractos doblemente hidrolizados con tripsina/quimotripsina y pepsina/quimotripsina (halos de inhibición entre 7 y 14 mm). Con respecto a la cepa de *Bacillus cereus*, todos los extractos doblemente hidrolizados y todos los extractos hidrolizados únicamente con tripsina inhibieron en gran medida el crecimiento de dicha cepa (halos de inhibición entre 8 y 18 mm).

Se evaluó el modo de acción de estos extractos inhibidores mediante el estudio de la cinética de crecimiento o muerte de las cepas blanco. Los extractos manoproteínicos de la cepa de *Candida blankii* LTW7 y de la cepa de *Pichia anomala* LTW6, ambos hidrolizados con tripsina, presentaron un efecto bacteriostático sobre las poblaciones celulares proliferantes de las cepas de *B. cereus* DBFIQ B 28 y de *L. monocytogenes* tipo I DTUNLu 328, respectivamente.

Se realizó un screening de la actividad anti-acetilcolinesterasa de todos los extractos hidrolizados de manoproteínas. Se observó una variada actividad inhibitoria frente a AChE, con un máximo de inhibición del 59 % por parte del extracto de *C. blankii* LTW7 hidrolizado con pepsina/quimotripsina.

De los extractos de manoproteínas más activos se seleccionaron los siguientes: los de *C. blankii* LTW7 hidrolizados con tripsina (42,6 %), con tripsina/quimotripsina (39,3 %) y con pepsina/quimotripsina (59 %); los de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 con proteinasa K (54,4 %) y con pepsina/quimotripsina (46,4 %); y el de *P. anomala* LTW6 hidrolizado con pepsina/quimotripsina (41,1 %). A cada uno de ellos se le determinó la concentración inhibitoria 50, siendo el extracto de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizado con pepsina/quimotripsina el que presentó el menor valor (6,8 mg ml<sup>-1</sup>).

El fraccionamiento de los 6 extractos manoproteínicos seleccionados por cromatografía de fase reversa empleando diferentes porcentajes de acetonitrilo (ACN), permitió obtener 6 fracciones con actividad inhibitoria importante



frente a AChE. Las fracciones obtenidas al 15 % de ACN de los extractos de *C. blankii* LTW7 hidrolizados con tripsina y pepsina/quimotripsina presentaron la mayor actividad inhibitoria (64 %).

Dichas fracciones se analizaron por HPLC, Espectrometría de Masas MALDI-TOF y se determinó la presencia/ausencia y el tipo de azúcares presentes. Se pudo comprobar la presencia de péptidos principalmente hidrofílicos, cuyo peso molecular estuvo comprendido entre 700 y 4800 Da. Además, se realizó una hidrólisis ácida y se determinó por HPAEC-PAD, la presencia de azúcares en todas las fracciones, siendo manosa el azúcar mayoritario. También todas las fracciones presentaron glucosa y otras, además, una cantidad minoritaria del carbohidrato glucosamina.

Posteriormente, las fracciones más activas se separaron por cromatografía de afinidad, obteniéndose dos nuevas fracciones: una fracción peptídica (FP) y una fracción glicopeptídica (FGP). Los resultados demostraron que todas las FPs y FGPs presentaron actividad inhibitoria frente a AChE, y que las FGPs exhibieron mayor capacidad de inhibición que las FPs, con valores de actividad comprendidos entre 49,3 y 77,8 %. La FGP de *C. blankii* LTW7 hidrolizada con pepsina/quimotripsina fue la que presentó el mayor porcentaje de inhibición. Asimismo, comparando con la fracción completa correspondiente, todas las FGPs presentaron mayores valores de inhibición, mientras que las FPs mostraron menores porcentajes de actividad antiacetilcolinesterasa. A continuación, las FPs se analizaron por Espectrometría de Masas LC-MS/MS, lo que permitió obtener diversas secuencias peptídicas características de dichas fracciones.

#### *Hidrolizados proteicos obtenidos de cultivos microbianos en soluciones de caseínas y del producto comercial NZ-Case Plus*

El método de obtención de los hidrolizados proteicos (HP) libres de células resultó adecuado en todos los casos. La hidrólisis tanto de la caseína como del sustrato comercial NZ-Case Plus por parte de todas las cepas de BAL y levaduras fue confirmada tanto por SDS-PAGE como por determinación del grado de hidrólisis. La actividad inhibitoria frente a ambas enzimas, tanto AChE como ECA, fue nula o baja. Ninguno de los HP presentó actividad antimicrobiana frente a las cepas bacterianas ensayadas.

*Conclusiones:*

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis evidencian que la hidrólisis de manoproteínas obtenidas a partir de cepas de levaduras provenientes de ecosistemas alimentarios regionales, condujo a la formación de una gran cantidad y variedad de péptidos y/o glicopéptidos con propiedades antimicrobianas y antiacetilcolinesterásicas, aunque carentes de propiedades antihipertensivas considerables. La actividad anti-AChE, sumada a la actividad antimicrobiana, los hacen potencialmente aptos para ser utilizados como aditivos alimentarios funcionales y/o como agentes terapéuticos.

Por lo tanto las fracciones, tanto peptídicas como glicopeptídicas, que presentaron importante actividad inhibitoria frente a AChE, deben ser muy tenidas en cuenta para la realización de futuros estudios relacionados con el tratamiento y control de la enfermedad de Alzheimer. Además, los resultados logrados revisten considerable importancia en función de que la inhibición de AChE no sólo es considerada como un enfoque prometedor en el tratamiento de la EA, sino también en posibles aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, el envejecimiento y la miastenia gravis. Por otra parte, debe también considerarse su probable aporte a la prevención o disminución de la incidencia de estas enfermedades, mediante la formulación de alimentos funcionales específicos que, en el futuro cercano, puedan contribuir a lograr un mayor control en el desarrollo inicial de las mismas.



# **ABSTRACT**

**ABSTRACT**

---

Nowadays it is fully assumed that functional foods, besides playing the role of nutrients, can not only provide bioactive compounds and health benefits to the human body, but also reduce the risk of certain diseases. Researches on the design and development of functional foods have devoted special attention to the study of the physiological role of dietary proteins. Bioactive peptides encrypted in the structure of these proteins are usually generated *in vivo* by the action of gastrointestinal enzymes, or may also be obtained *in vitro* with specific enzymes, and/or occur during the development of biotechnological processes of certain foods. Bioactive peptides may exert their effects on the cardiovascular, digestive, immune and nervous systems, among others.

In this work, it was intended to research and evaluate the *in vitro* inhibitory activity against acetylcholinesterase enzyme (AChE) and angiotensin converting enzyme (ACE) as well as the antimicrobial activity of both mannoprotein hydrolysates obtained by enzymatic hydrolysis and protein hydrolysates (PH) obtained from cultures of lactic acid bacteria (LAB) and yeasts in casein and commercial hydrolysed NZ-Case Plus solutions. In addition, fractionation and characterization of hydrolysates with the most interesting bioactive properties were also among the objectives.

*Extracts of mannoproteins*

Five extracts of mannoproteins from 5 yeast strains were obtained by thermal extraction and subsequent separation with Concanavalin A and dialysis. Each mannoprotein extract was hydrolysed with trypsin, pepsin, proteinase K and chymotrypsin. The proteolytic capacity on each extract of mannoprotein was confirmed by Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and determination of degree of hydrolysis.

Inhibitory activity of all hydrolysed extracts of mannoproteins against ACE was nil or low, with a maximum activity value of 19.7 % for *Saccharomyces cerevisiae* LBFIQ L2 extract hydrolysed with pepsin/ chymotrypsin.

Antimicrobial activity against Gram (+) and Gram (-) bacteria was determined. Inhibition was observed only against *Listeria monocytogenes* type I DTUNLu 328 and *Bacillus cereus* DBFIQ B 28 bacteria.

Against *Listeria* strain, inhibition was found by the mannoprotein extract of *Pichia anomala* LTW6 hydrolysed with trypsin and by certain extracts doubly hydrolysed with trypsin/chymotrypsin and pepsin/chymotrypsin (inhibition halos between 7 and 14 mm). With regard to *Bacillus* strain, all doubly hydrolysed extracts and all extracts hydrolysed only with trypsin inhibited it to a great extent (inhibition halos between 8 and 18 mm).

The mode of action of these inhibitory extracts was evaluated by studying the kinetics of growth or death of the target strains. Mannoprotein extracts of *Candida blankii* LTW7 and *Pichia anomala* LTW6 strains, both hydrolysed with trypsin, showed a bacteriostatic effect on the proliferating cell populations of the strains of *B. cereus* DBFIQ B 28 and *L. monocytogenes* type I DTUNLu 328, respectively.

A screening of the anti-acetylcholinesterase activity of all hydrolysed mannoprotein extracts was performed. A wide inhibitory activity against AChE was observed, with a maximum inhibition of 59 % by the extract of *C. blankii* LTW7 hydrolysed with pepsin/chymotrypsin.

Of the most active mannoprotein extracts, the following ones were selected: those of *C. blankii* LTW7 hydrolysed with trypsin (42.6 %), with trypsin/chymotrypsin (39.3%) and pepsin/chymotrypsin (59 %); those of *S. cerevisiae* DBFIQ L2, with proteinase K (54.4%) and pepsin/chymotrypsin (46.4 %); and those of *P. anomala* LTW6 hydrolyzed with pepsin/chymotrypsin (41.1 %). Inhibitory concentration 50 was determined to each of them, the extract of *S. cerevisiae* DBFIQ L2 hydrolysed with pepsin and chymotrypsin having the lowest IC50 value against AChE (6.8 mg ml<sup>-1</sup>).

Fractionation of the 6 selected mannoprotein extracts by reverse-phase chromatography using different percentages of acetonitrile (ACN) allowed obtaining 6 fractions with significant inhibitory activity against AChE. Fractions obtained at 15 % of ACN of *C. blankii* LTW7 extracts hydrolysed with pepsin and with trypsin/chymotrypsin showed the highest inhibitory activity (64 %).

These fractions were analyzed by HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry, the presence/absence and type of sugars being also determined. Peptides - mainly hydrophilic-, whose molecular weight was between 700 and 4800 Da, were detected. In addition, acid hydrolysis was performed and the presence of

sugars in all fractions was determined by HPAEC-PAD, mannose being the sugar in greatest proportion. All fractions also presented glucose and some of them a minor amount of glucosamine.

Subsequently, the most active fractions were separated by affinity chromatography, two new fractions being obtained: a peptide fraction (PF) and a glycopeptide fraction (GPF). Results showed that all the PFs and GPFs had inhibitory activity against AChE, and that GPFs showed greater inhibition than PFs, with activity values ranging between 49.3 and 77.8 %, the GPF *C. blankii* LTW7 hydrolysed with pepsin/chymotrypsin having the highest percentage of inhibition. Likewise, compared to the corresponding complete fraction, all GPFs had higher values of inhibition, while the PFs showed lower percentages of anti-acetylcholinesterase activity. Then, PFs were analyzed by LC-MS/MS mass spectrometry, which allowed obtaining several peptide sequences characteristic of such fractions.

*Protein hydrolysates obtained from microbial cultures in casein and commercial hydrolysed NZ-Case Plus solutions.*

The method of obtaining cell free protein hydrolysates (PH) was adequate in all cases. Hydrolysis of both casein and commercial hydrolysate NZ-Case Plus by all strains of LAB and yeasts was confirmed both by SDS-PAGE and degree of hydrolysis. The inhibitory activity against both enzymes, either AChE or ACE, was nil or low. None of the HP presented antimicrobial activity against the bacterial strains tested.

*Conclusions*

The results obtained in this Thesis show that the hydrolysis of mannoproteins obtained from yeast strains from regional food ecosystems led to the formation of a large number and variety of peptides and/or glycopeptides with antimicrobial and anti-acetylcholinesterase properties, though lacking considerable antihypertensive properties. Therefore, bioactive peptidic fractions should be taken into account for future studies regarding Alzheimer's disease due to their significant inhibitory activity against AChE.

AChE inhibition emerges also not only as a promising approach in treating Alzheimer's disease but in potential therapeutic applications in Parkinson disease, ageing and myasthenia gravis. On the other hand, it may contribute to preventing or reducing the incidence of these diseases by formulating specific functional foods which could, in the near future, permit a greater control in their initial development.

As a final conclusion we can say that anti-acetylcholinesterase property, together with the antimicrobial activity, make the bioactive peptidic fractions potentially suitable for use as functional food additives and/or as therapeutic agents.



# **INTRODUCCIÓN**





## ALIMENTOS FUNCIONALES

---

Siempre se ha considerado como *alimento* a cualquier producto, natural o transformado, que suministra al organismo que lo ingiere la energía y las sustancias químicas necesarias para mantenerse en buen estado de salud; y como *nutrientes*, a las sustancias químicas contenidas en los alimentos que el organismo utiliza, transforma e incorpora a sus propios tejidos. Estos nutrientes incluyen a las proteínas, carbohidratos, lípidos, minerales, vitaminas y al agua. Son bien conocidas las funciones desempeñadas por cada uno de estos nutrientes, las cuales son esenciales para la vida de los organismos vivos; de allí que la primera o principal función, “*función primaria*”, vinculada a los alimentos es la *función nutricional*. La segunda función o “*función secundaria*” que se atribuye a los alimentos es su capacidad para estimular el apetito, según el grado de aceptación o rechazo que provoquen, la cual depende de sus características organolépticas (color, sabor, olor y textura), y que podría denominarse como *función sensitiva o sensorial*. Esta función de los alimentos estimula las funciones psicosenoriales que ejercen influencia favorable sobre las secreciones gástricas, hepáticas y pancreáticas, así como sobre la motilidad del tubo digestivo. Además de los nutrientes y componentes de aroma, sabor, color y textura, algunos alimentos contienen ciertas sustancias químicas capaces de tener efectos positivos para promover y/o restaurar la salud, lo que permite atribuirles una “*función terciaria*” o “*función saludable*”. En las décadas de 1980 y 1990 se comenzó a dar importancia en el hemisferio occidental a esta función terciaria de los alimentos, que está implicada en la modulación de los sistemas fisiológicos de los organismos vivos, tales como los sistemas inmune, endócrino, nervioso, circulatorio y digestivo, y a partir de entonces se introdujo en occidente el término “*alimentos funcionales*”.

El concepto de alimento funcional ha sido evaluado y discutido en profundidad y existen distintos trabajos de revisión de su definición (Roberfroid, 2000a; Roberfroid, 2002). Los *alimentos funcionales* se definen, según el International Life Science Institute (ILSI), como “aquellos alimentos que aportan efectos beneficiosos sobre una o más funciones fisiológicas, más allá de los efectos nutricionales, y que van encaminados a mejorar el estado de salud y bienestar o a reducir el riesgo de trastornos en el organismo” (Diplock y col., 1998).

Según el proyecto FUFUSE (Functional Food Science in Europe), un *alimento funcional* debe cumplir ciertos requisitos:

- En primer lugar, debe ser consumido habitual o diariamente como parte de la dieta normal.
- Debe estar constituido por ingredientes naturales no presentes en el alimento original o en mayor concentración a la existente en dicho alimento.
- Sus efectos beneficiosos deben demostrarse científicamente y deben ser distintos a los meramente nutritivos.
- Además, deben mejorar el estado de salud del individuo, su calidad de vida y/o disminuir el riesgo de ciertas patologías.
- Finalmente, su consumo y sus efectos deben estar autorizados por organismos nacionales o internacionales de control y seguridad alimentaria.

La obtención de alimentos funcionales puede llevarse a cabo por la adición de probióticos, prebióticos, simbióticos o ingredientes funcionales. Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se ingieren en cantidades suficientes, ejercen efectos positivos en la salud, adicionales a los meramente nutricionales (Vinderola y col., 2002). Se incluyen los efectos beneficiosos de estos microorganismos sobre el hospedador, mejorando, por ejemplo, su balance microbiano intestinal (Gorbach, 2000). El crecimiento de los microorganismos del tracto gastrointestinal puede promoverse también por los prebióticos, generalmente de naturaleza oligosacáridica, no digeribles pero fermentables por distintas especies de bacterias lácticas (Roberfroid, 2000b). La combinación de probióticos y prebióticos, denominada simbióticos, mejora la supervivencia de los primeros, además de producir una mayor colonización de la microbiota colónica (Roberfroid, 2000b). Entre los ingredientes funcionales podemos nombrar a las  *fibras solubles e insolubles*, los *ácidos grasos polinsaturados y fitosteroles*, los *derivados fenólicos*, *péptidos bioactivos*, *antioxidantes* y *vitaminas o minerales*, entre otros.

La transformación de un alimento en *funcional* puede realizarse eliminando algún componente nocivo (alérgeno, grasa saturada), fortificándolo con sustancias beneficiosas (cereales con minerales, pan con fibra, leche con calcio), adicionándolo de un elemento no presente de forma habitual en el mismo (aceite con antioxidantes), sustituyendo un compuesto perjudicial por

otro deseable (grasas por inulina, leche desnatada con ácidos grasos  $\omega$ -3) u optimizando la biodisponibilidad/estabilidad (Marriott, 2000).

Actualmente los alimentos funcionales disponen de un lugar de aceptación y reconocimiento entre la población, por lo que la aparición y desarrollo de nuevos productos sigue la tendencia de un crecimiento sostenido (Rodríguez Silveira y col., 2003).

### ***Péptidos bioactivos***

Las proteínas representan uno de los componentes principales de los alimentos, tanto desde un punto de vista funcional como nutricional. Por una parte, determinan las propiedades físicas y organolépticas de muchos alimentos. Así, la consistencia y textura de la carne, queso o pan, dependen en gran medida de la naturaleza de las proteínas que los constituyen. Pero también en alimentos elaborados con una presencia menor de proteínas, éstas pueden jugar un papel muy importante, influyendo en características funcionales tales como la absorción de agua o aceite, o la formación de emulsiones, geles y espumas. Además, las proteínas constituyen un aporte nutricional importante, representando una fuente de energía, nitrógeno y aminoácidos esenciales.

En los últimos años, el estudio de las proteínas de los alimentos como componentes beneficiosos, no sólo desde un punto de vista funcional o nutricional, está recibiendo una gran atención. En este sentido, se investiga la presencia de diferentes péptidos bioactivos en proteínas de diversos tipos de alimentos. Fragmentos o péptidos bioactivos encriptados en las estructuras de dichas proteínas, se generan usualmente *in vivo* por acción de enzimas gastrointestinales, o pueden también obtenerse *in vitro* con enzimas específicas, y/o producirse durante los procesos biotecnológicos de elaboración de determinados alimentos. Estos péptidos funcionales o bioactivos se definen como secuencias de aminoácidos inactivas en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas (Tabla 1) tras su liberación (Meisel, 1998).

Los péptidos bioactivos pueden ejercer su efecto, entre otros, sobre los sistemas cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso (Korhonen y

Pihlanto, 2003). Dentro de estas actividades, los péptidos bioactivos podrían influir en el metabolismo celular y actuar como vasorreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores (Robert y Zaloga, 1994), o poseer propiedades antimicrobianas (Gobbetti y col., 2002). Además, algunos péptidos son multifuncionales y pueden ejercer más de uno de los efectos mencionados (Meisel, 2004).

**Tabla 1:** Péptidos bioactivos y sus efectos saludables

<b>Péptidos</b>	<b>Efecto beneficioso</b>
Opioides	Regulan el tránsito intestinal Mejoran la digestión y absorción
Inmunomoduladores	Estimulan la respuesta inmune
Transportadores de minerales	Mejoran la absorción de minerales y metales
Antitrombóticos	Reducen los riesgos de padecer trombosis
Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Antioxidantes	Previenen enfermedades degenerativas y envejecimiento
Antimicrobianos	Reducen el riesgo de infecciones
Hipocolesterolémicos	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares

Así pues, las características nutricionales de una proteína determinada no se limitarían sólo al aporte de nitrógeno, energía y aminoácidos esenciales, sino que también habría que considerar la actividad de péptidos bioactivos que pueden ser liberados de estas proteínas durante el procesado del alimento o la digestión gastrointestinal, ejerciendo diversas funciones metabólicas beneficiosas para el organismo.

Los péptidos bioactivos han sido encontrados principalmente en las proteínas de la leche y en derivados de ésta tales como quesos o yogurts. Pero también se ha observado su existencia en otras proteínas animales, entre las que pueden mencionarse las de pescados y diversos vegetales como soja, arroz o garbanzo, e incluso en diferentes microorganismos, como levaduras y hongos filamentosos.

### **MANOPROTEÍNAS DE LEVADURA**

---

#### ***Levaduras***

Las levaduras son hongos unicelulares (10-20  $\mu\text{m}$  de diámetro). Son organismos eucariotas, sin clorofila, heterótrofos, que se nutren por digestión externa y absorción a través de su pared celular. La mayoría de las levaduras se consideran como organismos aerobios facultativos, lo que significa que pueden sobrevivir y crecer con o sin oxígeno. Si disponen de oxígeno las levaduras realizan respiración aeróbica para metabolizar los azúcares hasta dióxido de carbono y agua, y si no disponen de él pueden seguir distintos caminos fermentativos.

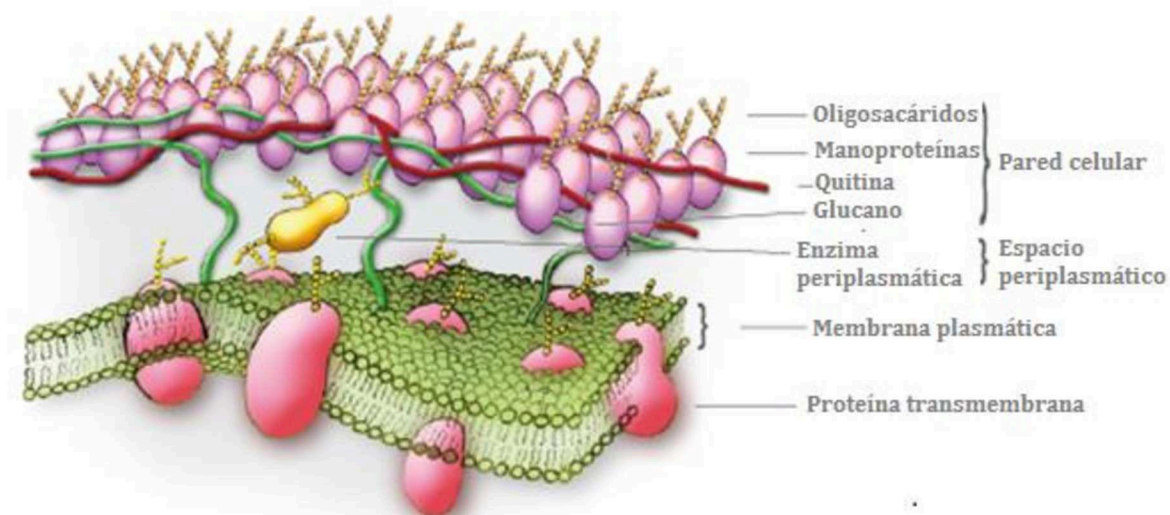
La estructura celular de una levadura es bastante sencilla. Son los organismos eucariotas más primitivos, y por tanto presentan las estructuras típicas de este modelo de organización celular. La envoltura más externa de las levaduras está integrada por tres constituyentes mayoritarios (de adentro hacia afuera): la membrana plasmática, el espacio periplasmático y la pared celular (Figura 1). En *Saccharomyces cerevisiae*, la envoltura celular abarca el 15 % del volumen celular total, y tiene un rol primordial en el control de las propiedades osmóticas y en la permeabilidad de la célula.

La membrana plasmática tiene aproximadamente 7 nm de espesor, con algunas invaginaciones dentro del citosol. Como otras membranas, es una capa lipídica con proteínas insertadas en esta capa o que la atraviesan como proteínas transmembranas, las cuales poseen diversas funciones.

La función primaria de la membrana celular de las levaduras es promover la permeabilidad selectiva, por ejemplo: controlando qué entra y qué sale desde el citosol. Más importante es el rol de las proteínas de membrana en lo que respecta a la regulación de la nutrición de la levadura, como en la adsorción

de carbohidratos, compuestos nitrogenados o iones, y en la extracción de moléculas peligrosas para la célula. Otros aspectos importantes incluyen exo y endocitosis de moléculas cargadas, respuesta al estrés y esporulación.

**Figura 1:** Envoltura externa de las levaduras



La envoltura externa de las levaduras está dividida en 3 regiones principales. En la parte inferior se observa la membrana plasmática, la cual está compuesta por una doble capa lipídica donde se insertan diferentes proteínas transmembrana. En el centro se encuentra el espacio periplasmático, el cual contiene otras proteínas, que cumplen principalmente funciones de hidrólisis. En la parte más externa se encuentra la pared celular, la cual está compuesta por dos capas de polisacáridos, una capa interna, constituida principalmente de 1,3- y 1,6- $\beta$ -glucanos, y otra capa externa, principalmente compuesta de manoproteínas, las cuales se anclan a la capa interna de  $\beta$ -glucanos, o bien la atraviesan (adaptado de Gañan y col., 2007).

El periplasma de las levaduras es delgado, está asociado a la región externa de la membrana plasmática y a la región interna de la pared celular. Principalmente contiene proteínas que cumplen funciones esenciales en la hidrólisis de sustratos que no atraviesan la membrana plasmática (Walker, 1998).

La pared celular de las levaduras está constituida por polisacáridos y glicoproteínas (manoproteínas) en forma de una red tridimensional, que funciona como una estructura altamente dinámica y adaptable al medio que la rodea. Es capaz de adaptarse a cambios fisiológicos (multiplicación logarítmica o en fase estacional) y morfológicos (conjugación, esporulación y crecimiento), o a las condiciones ambientales de su entorno. Las principales funciones de la pared celular están encaminadas a garantizar la supervivencia de la célula.

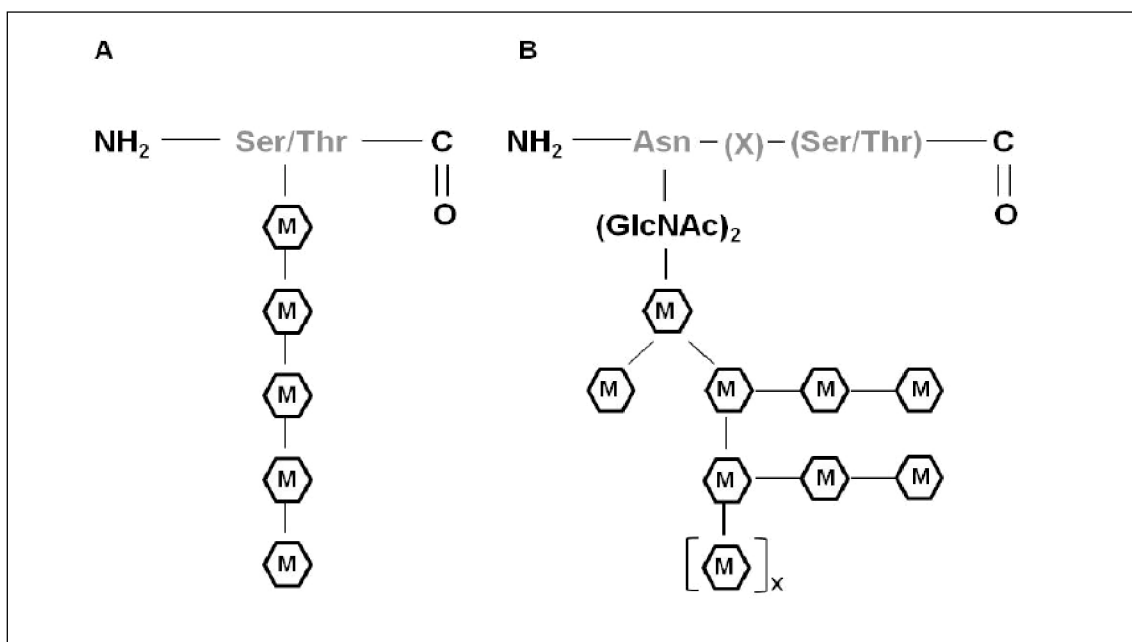
El estudio de la síntesis, composición y ensamblaje de la pared celular en levaduras ha ido en aumento en los últimos años. La pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* se encuentra constituida principalmente por polisacáridos, con una proporción del 58 % de  $\beta$ -glucanos (glucosa, manosa y N-acetilglucosamina), 40 % de manoproteínas y un 2% de quitina (Fleet y Manners, 1977; Ganzazade y col., 1997; Klis, 1994). Ésta puede variar considerablemente en estructura y composición en respuesta al estrés, condiciones de cultivo, edad y a modificaciones genéticas (Aguilar-Uscanga y Francios, 2003; Ha y col., 2002; Klis y col., 2002). La pared celular está compuesta por dos capas de polisacáridos: una capa interna transparente y amorfa, constituida principalmente de  $\beta$ -(1,3) y (1,6)-glucanos, compuestos mayoritarios de la pared, responsables de mantener la forma y rigidez a la célula y que además favorecen la resistencia a los cambios osmóticos y mecánicos (Cid y col., 1995; Heinisch y Hollenberg, 1993); y una capa externa donde se ubican las manoproteínas.

Las manoproteínas son polipéptidos altamente glicosilados, a menudo con 50 a 95 % en peso de hidratos de carbono. Las mismas son mayoritariamente N- y O-glicosiladas a residuos de asparagina o a residuos de serina o treonina, respectivamente. El enlace O-glicosídico se produce entre un grupo hidroxilo del carbono anomérico de una manosa y el grupo hidroxilo de los hidroxiaminoácidos serina o treonina de la proteína. Con este tipo de enlace se unen cadenas lineales cortas de 1-5 manosas unidas, a su vez, entre ellas por enlaces  $\alpha$ -(1,2) y  $\alpha$ -(1,3) (Lesage y Bussey, 2006) (Figura 2A). El enlace N-glicosídico se establece entre el grupo amino libre de un residuo de asparagina que forme parte de la secuencia: Asp-X-Ser/Thr y el C1 de la primera N-acetilglucosamina (Figura 2B).

Dichas manoproteínas están densamente empaquetadas y limitan la permeabilidad de la pared a los solutos. Se encuentran ubicadas en la capa

externa, ancladas a la capa interna de  $\beta$ -glucanos, o bien atravesándola completamente. Son las responsables de la porosidad de la pared, juegan un rol de filtro selectivo y protección contra ataques químicos y enzimáticos de tipo glucanasa (Cid y col., 1995; Nguyen y col., 1998; Zlotnik y col., 1984). No existe separación neta entre las dos capas de polisacáridos (Verduyn y col., 1992). Por otro lado la capa interna parece estar constituida de varios espacios, formados por quitina unida a  $\beta$ -glucanos. La quitina juega un rol importante en la morfología y durante la formación de células en el ciclo celular, tiene la función de formar la cicatriz durante la separación de las células madre e hija (gemación), encontrándose la mayor concentración de quitina en la formación de la gema (Lipke y Ovalle, 1998). A nivel molecular, la arquitectura de la pared celular parece estar constituida por bloques de construcciones flexibles, que reagrupan a los componentes a través de uniones covalentes como una estructura ordenada (Heinisch y Hollenberg, 1993; Cabib y col., 2001).

**Figura 2:** Patrones de glicosilación de manoproteínas



Enlaces glicosídicos presentes en la estructura de las manoproteínas de levadura: **(A)** O-glicosídico. **(B)** N-glicosídico. Asn: asparagina. GlnNAc: N-acetilglucosamina. Ser: serina. Thr: treonina. X: cualquier aminoácido. M: manosa (adaptado de Blasco y col., 2011).



### ***Aplicaciones de las levaduras***

La relación de las levaduras con el hombre viene desde tiempos remotos, ya que constituyen el tipo de microorganismo más viejo y mejor comprendido por el hombre. Desde el año 6000 AC las levaduras fueron empleadas para la fabricación de bebidas del tipo de la cerveza. La ciencia de las levaduras comenzó en 1680 con la invención del microscopio, cuando se las describió como “animalículos” que 150 años después se correlacionaron con la fermentación de los azúcares a etanol. Una industria completamente nueva surgió basada en estos resultados. Hoy las levaduras forman parte del acervo cultural del hombre, no sólo para producir bebidas sino para otros muchos usos.

Las levaduras son consideradas generalmente como favorables cuando se asocian a los alimentos, debido al papel que juegan en la obtención de productos y bebidas fermentables, entre los que se destacan la fabricación de pan y de productos de pastelería, así como la producción de alcohol, vinos, sidras y cervezas, entre otras bebidas. Esta imagen se ha fortalecido en la actualidad por el descubrimiento en estos microorganismos de capacidades nutricionales tales como: la producción de vitaminas del complejo B; su uso como fuente de obtención de proteínas para la alimentación de animales y humanos, las cuales contienen aminoácidos esenciales; el aporte de sales minerales y oligoelementos almacenados naturalmente y, además, la capacidad de generar el ácido graso  $\omega$ 3. Además, las levaduras se utilizan en productos alimenticios para mejorar el sabor y la textura, y para reducir la acidez, el gusto amargo y el contenido de sal utilizado en la preparación de dichos alimentos. Las levaduras se emplean también como probióticos en animales, estimulando su bienestar (reducción del riesgo de acidosis, reducción de la tensión y una mejoría general del cuerpo), dando valor realzado al alimento (un índice mejor de consumo) y, por lo tanto, contribuyendo a un mejor funcionamiento zootécnico. Por otro lado, se ensayó también su uso como hospedante para la obtención, por vías de la tecnología del ADN recombinante, de compuestos de gran utilidad para la industria médico farmacéutica, como proteínas virales para la fabricación de vacunas y otros inmunopotenciadores, hormonas, interferones, proteínas de la sangre y productos afines (Sasson, 1998).

Las industrias, entre ellas las vnicas y cerveceras, desechan al año toneladas de levaduras como subproducto de sus actividades, las cuales resultan poco provechosas comercialmente y son destinadas principalmente a la alimentación animal, debido a su bajo costo y a su elevado contenido de aminoácidos esenciales. Es por esto que diferentes estudios pretenden mostrar otros posibles usos alimentarios para las levaduras, específicamente para sus manoproteínas.

### ***Aplicaciones tecnológicas e industriales de las manoproteínas***

En los últimos años se han venido estudiando posibles usos para las diferentes fracciones que conforman la pared celular de las levaduras y se ha visto que las manoproteínas poseen características que pueden resultar provechosas dentro de la industria alimentaria. De igual manera se ha visto que el azúcar D-manosa y algunos compuestos ricos en este azúcar poseen propiedades sumamente interesantes, que podrian ser extrapolables a las manoproteínas presentes en la pared celular de ciertas levaduras.

Las manoproteínas son compuestos poco utilizadas en la industria alimentaria, pese a su fácil obtención, bajo costo y numerosas cualidades.

### ***Propiedades enológicas de las manoproteínas de las levaduras***

Varios son los alimentos que contienen de manera natural manoproteínas provenientes de la pared celular de las levaduras, el vino entre ellos, y se ingieren con el mismo de forma natural y sin provocar efectos adversos sobre la salud del consumidor, por lo que se trata de un grupo de compuestos GRAS (*Generally Recognized As Safe*). En la actualidad las manoproteínas son muy utilizadas como coadyuvantes tecnológicos en la industria enológica para evitar diversos problemas, tales como la precipitación tartárica o proteica. Tamben se las relaciona positivamente con la estabilidad del color, la contribución a dar untuosidad y disminuir la astringencia en vinos tintos, la fijación de algunos componentes aromáticos y la mejora de la calidad de la espuma de la cava (Martínez-Rodríguez y col., 2009).

### *Características bioemulsificantes*

Las manoproteínas han sido reconocidas por ser los mejores bioemulsificantes en la industria alimentaria, con un alto valor agregado como aditivos. Principalmente se han aislado manoproteínas con propiedades emulsificantes de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, levadura utilizada en la industria de panificación y cervecera. Los emulgentes son moléculas con un extremo afín al agua (hidrofilico) y otro afín al aceite (hidrofóbico). Hacen posible que el agua y el aceite se dispersen casi completamente el uno en el otro, creando una emulsión estable, homogénea y fluida. En la actualidad, los aditivos alimentarios emulgentes tienen una función relevante en la fabricación de productos alimenticios como la margarina, la mayonesa, las salsas cremosas, los caramelos, muchos alimentos procesados y envasados, los dulces y toda una gama de productos de panadería. Como agente emulsificante, las manoproteínas de *S. cerevisiae* presentan varias ventajas, como son su muy buena producción con altos rendimientos, su fácil extracción y purificación y además, como *S. cerevisiae* es comestible y es usada en la manufactura de bebidas y alimentos, es de esperar que las manoproteínas producidas por dicha levadura sean no tóxicas (Cameron y col., 1988).

### *Las manoproteínas como potenciales nutraceuticos*

Se ha determinado que las manoproteínas pueden ser beneficiosas para numerosas funciones metabólicas en humanos y en animales, por lo que podrían ser empleadas como suplemento nutraceutico en la industria alimentaria.

Sus beneficios se han observado en la industria cárnica y avícola, y los mismos consisten en el aumento de la repuesta inmune y mejoras en la digestión y absorción de nutrientes en animales destinados al consumo humano, lo que puede hacer posible su utilización para la optimización de su crecimiento. En los últimos años se ha visto que el uso de productos que contienen manosa como complemento dietético de algunos animales de granja destinados al consumo humano, puede producir efectos positivos en su desarrollo. Entre dichos efectos destacan la adsorción de enterobacterias que expresan fimbrias tipo 1, el mejoramiento de la salud intestinal, la modulación del sistema inmune y la degradación de aflatoxinas (Hooge, 2004).

### *Efectos sobre enteropatógenos*

Los antibióticos han sido utilizados como suplemento en la dieta de animales destinados al consumo humano durante los últimos 50 años, con el fin de actuar como promotores del crecimiento y controlar numerosas enfermedades de origen bacteriano (White y col., 2002). Sin embargo, el uso de antibióticos ha sido un tema ampliamente discutido, debido a su efecto residual y al desarrollo de resistencia bacteriana. Debido a lo anterior es que se están estudiando alternativas a estos compuestos. Una de tales alternativas es la inclusión de compuestos ricos en manosa en la dieta de los animales. Se sabe que la adherencia y colonización de las bacterias enteropatógenas a las células epiteliales del intestino del hospedador es un evento fundamental en la patogenicidad bacteriana, y que dicha colonización viene mediada por lo general por unas proteínas de superficie de las bacterias, llamadas lectinas. Estas proteínas se adhieren a los receptores en el epitelio del hospedador, los cuales se unen específicamente a las glicoproteínas con extremos de manosa en la superficie de células eucariotas (Firon y col., 1987; Mirelman y col., 1980).

En base a lo anterior, podría ser posible bloquear las lectinas de ciertos enteropatógenos con manosa para impedir la adherencia de las bacterias a las mucosas intestinales, y así evitar la colonización bacteriana (Santin y col., 2001). Diferentes estudios (Ishihara y col., 2000; Jamroz y col., 2004) observaron que al incluir compuestos ricos en manosa en la dieta de gallinas disminuye la incidencia de *Salmonella enteritidis* en las heces y se mejora el balance de la microflora intestinal, aumentando la proporción de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. White y col. (2002) comprobaron que al añadir levaduras en la dieta de cerdos se reducía el conteo de coliformes totales en el intestino. Además, se observó en otros estudios, realizados con *Campylobacter jejuni*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, la disminución de la adhesión de estos enteropatógenos a las paredes intestinales al incluir levaduras o manosa provenientes de la pared celular en la dieta de pollos (Schoeni y Wong, 1994; Spring y col., 2000; Line y col., 1998; Burkey y col., 2004; Naughton y col., 2001).

Por ende, al evitar la adhesión y colonización de las enterobacterias en animales de granja, es posible disminuir el uso de antibióticos y aminorar la

incidencia de enfermedades entéricas en humanos ocasionadas por la ingesta de estos animales (Gañan y col., 2007).

### *Efectos sobre el sistema inmunológico*

Las paredes celulares de las levaduras y el azúcar D-manosa parecen tener efectos beneficiosos sobre el sistema inmunológico de los animales de granja. Se ha observado que al suplementar las dietas de pollos de corral con paredes celulares de levaduras se logra un aumento en los niveles de IgG y IgA en sangre (Santin y col., 2001). Se cree que el mencionado incremento en la respuesta inmune es debido a que el sistema inmunológico del organismo hospedador reconoce a las manoproteínas como material externo antigénico de origen microbiano, lo cual induce a la sobreproducción de anticuerpos (Cetin y col., 2005).

Al incrementar la respuesta inmune de los animales de granja de manera natural se puede mejorar su habilidad para resistir enfermedades y favorecer su crecimiento, a la vez que se disminuye el uso de los antibióticos.

### *Efectos sobre la salud intestinal*

Las levaduras y sus derivados han mostrado también efectos positivos sobre la salud intestinal de animales de granja. Santin y col. (2001) observaron que al incluir paredes celulares de *S. cerevisiae* en la alimentación de pollos se produce un aumento en el tamaño de las vellosidades de las mucosas intestinales, lo que permite una mayor absorción de nutrientes, con el consecuente aumento en el tamaño de las aves. Estudios similares se han realizado en cerdos y se ha detectado un incremento en el peso de los alimentados con mano-oligosacáridos (Zdunczyk y col., 2005; Davis y col., 2002).

Estos hallazgos son muy útiles para la industria alimentaria, ya que se podrían utilizar levaduras o sus paredes celulares como suplementos alimenticios en la dieta de animales de corral. Con ello se lograría una mejor digestión y absorción de nutrientes y un incremento en la talla de estos animales, lo que disminuiría el uso de suplementos no naturales. De igual manera, al lograr un mejor aprovechamiento de los nutrientes se lograría un

mejor estado nutricional, lo que podría suponer cierta protección contra el ataque de patógenos.

### *Acción de las manoproteínas sobre las micotoxinas*

La estructura de la pared celular de *S. cerevisiae* no sólo exhibe un alto grado de antigenicidad por sus fracciones de  $\beta$ -glucanos y manosa, sino que estudios *in vitro* recientes han sugerido que esta estructura, constituida principalmente por polisacáridos, es capaz de llevar a cabo reacciones de absorción frente a ciertas micotoxinas tales como zearalenona, aflatoxinas y ocratoxina (Yiannikouris y col., 2003; Yiannikouris y col., 2004; Ringot y col., 2005). Las micotoxinas son un grupo diverso de compuestos químicos tóxicos (metabolitos secundarios) producidos por una gran variedad de hongos (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* y *Alternaria*) (Pfohl-Leszkowicz, 2000). Algunos ejemplos de micotoxinas identificadas en materias primas y alimentos contaminados utilizados en avicultura son: aflatoxinas, ocratoxina, zearalenona, toxina T-2, vomitoxina y fumonisina (Jelinek y col. 1989). La intoxicación por micotoxinas puede presentar efectos en la salud del individuo, tales como efectos hepatotóxicos, nefrotóxicos, inmunosupresores, teratogénicos y mutagénicos (Veldman, 2004).

Las manoproteínas son capaces de absorber y degradar ciertas aflatoxinas, reduciendo su absorción gastrointestinal y disminuyendo su nivel en los tejidos de gallinas y pollos de corral, lo que podría reducir el riesgo de contaminación en los consumidores de estas carnes (Zaghini y col., 2005).

Diferentes procedimientos de descontaminación en la elaboración del vino estudiados hasta el momento emplean lías de levadura o paredes celulares (Bejaoui y col., 2004; Moruno y col., 2005; Caridi y col., 2006). En este contexto, algunas levaduras actuarían como «esponjas», adsorbiendo la ocratoxina presente en el vino durante el proceso de elaboración. En este proceso de eliminación de la toxina aparecen implicados compuestos de la pared celular de las levaduras, en particular las manoproteínas constituyentes de la misma. Esta propiedad de las manoproteínas permite aumentar la seguridad y funcionalidad del vino, favoreciendo también la calidad higiénico-sanitaria y nutricional del mismo.

## PROTEÍNAS DE LA LECHE

---

### ***Composición proteica de la leche***

La leche está compuesta principalmente por agua, carbohidratos, lípidos y proteínas, así como por otros constituyentes minoritarios como las enzimas, vitaminas y sales minerales. Las proteínas se encuentran en una proporción de 30-35 g l<sup>-1</sup>, constituyendo la fracción más compleja de la leche. Existen dos tipos de proteínas lácteas, las caseínas, que representan el 80 %, y las proteínas de suero.

### ***Proteínas de suero***

Con la expresión proteínas de suero o proteínas solubles se engloba a un conjunto de proteínas que permanecen en la fase líquida tras la precipitación de la caseína a pH 4.6 y 20 °C (Whitney, 1988). Algunos péptidos de bajo peso molecular procedentes de la hidrólisis de caseína, al ser soluble al pH y la temperatura citados, también se incluyen en este grupo de proteínas.

Las proteínas séricas mayoritarias son la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg),  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La), seroalbúmina (BSA) e inmunoglobulinas (Ig) (Fox y Flynn, 1994). Las proteínas minoritarias incluyen la lactoferrina (Lf) y distintas enzimas, como la plasmina y la lactoperoxidasa.

### ***Caseína***

Como caseína se denomina a un grupo de proteínas que permanecen insolubles a pH 4.6 y 20 °C (Whitney, 1988). Bajo la denominación de caseína se incluyen cuatro tipos de cadenas polipeptídicas,  $\alpha_{s1}$ -caseína ( $\alpha_{s1}$ -CN),  $\alpha_{s2}$ -caseína ( $\alpha_{s2}$ -CN),  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -CN) y  $\kappa$ -caseína ( $\kappa$ -CN). Las secuencias de sus estructuras primarias son complejas y muy diferentes a las de otras proteínas, debido al alto contenido del aminoácido prolina y a las regiones ácidas que incluyen los residuos de fosfoserina (Creamer y MacGibbon, 1996). La conformación secundaria de las distintas caseínas está poco organizada ( $\alpha$ -hélice y lámina  $\beta$ -plegada de longitudes cortas), similar a la estructura de las proteínas globulares desnaturizadas (Walstra y Jenness, 1987).

### ***Proteínas lácteas como fuente de ingredientes funcionales***

La leche y los productos lácteos son fuente de proteínas de una alta calidad nutricional. Además de su elevado valor nutritivo, en los últimos años se ha visto que algunas de estas proteínas o péptidos derivados de las mismas presentan diversas actividades fisiológicas. Por lo tanto son muy interesantes desde el punto de vista tecnológico, ya que pueden emplearse como ingredientes para desarrollar nuevos alimentos funcionales. Especialmente el suero de quesería, un subproducto de la industria láctea, es un suplemento proteico muy popular en distintos alimentos funcionales (Recio y López-Fandiño, 2005). A las proteínas del suero lácteo se les atribuyen distintas actividades biológicas tales como: beneficios para el sistema inmune; actividades antioxidante, antibacteriana, antifúngica y antiviral; y actividad anticancerígena, entre otras.

Además, la leche y los productos lácteos han mostrado ser una fuente muy rica en péptidos liberados por hidrólisis, los cuales pueden exhibir también diferentes actividades biológicas.

La “alimentación personalizada” es un nuevo concepto de nutrición que se basa en la atención de las necesidades nutricionales de cada individuo según su edad, estado físico, enfermedades, etc. La mayoría de los péptidos bioactivos no se absorben en el tracto gastrointestinal, ejerciendo una función directa en el lumen intestinal, o bien interaccionando con receptores que se encuentran en la pared del intestino. Algunos de estos receptores podrían estar implicados en determinadas enfermedades como cáncer, diabetes, osteoporosis, stress, obesidad o afecciones cardiovasculares. De esta manera, los péptidos bioactivos derivados de las proteínas lácteas entran dentro del nuevo concepto de “nutrición personalizada” y abren un abanico de posibilidades dentro del mercado de los alimentos funcionales (Korhonen y Pihlanto-Lepälä, 2006).

La leche humana es probablemente el primer alimento funcional que una persona consume, y constituye el alimento esencial para el recién nacido durante los primeros meses de vida. La alimentación con leche materna proporciona multitud de beneficios para la salud, el crecimiento y el desarrollo del individuo, y reduce el riesgo de padecer diversas enfermedades crónicas en el futuro (Anonymous, 2005). Las proteínas presentes en la leche juegan un



papel fundamental en dichos beneficios, presentando diferentes actividades biológicas (Lönnerdal, 2004). Entre las actividades biológicas que se atribuyen a las proteínas de la leche humana se encuentran: aumento en la absorción de nutrientes, inhibición de enzimas, actividades enzimáticas, estimulación del crecimiento, modulación del sistema inmune y defensa contra patógenos. Además, recientemente se ha visto que la digestión de las proteínas de la leche humana puede liberar al medio péptidos bioactivos que podrían ser responsables, al menos en parte, de las propiedades beneficiosas de la leche. Mediante la hidrólisis de dichas proteínas con enzimas gástricas y pancreatina se han obtenido péptidos con actividad opiácea (Brantl, 1984), inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Maruyama y col., 1987), antitrombótica e inmunomodulante (Fiat y col., 1993), y antimicrobianas (Bellamy y col., 1992).

A partir de la leche procedente de distintas especies de mamíferos se pueden obtener una gran variedad de péptidos. Sin embargo, estos péptidos van a ser distintos debido a diferencias cualitativas y cuantitativas entre las proteínas lácteas de las distintas especies. En una misma especie también puede haber variaciones dependientes de la alimentación, el estado de lactación e incluso de los ciclos circadianos (Britton y Kastin, 1991). Por último, la utilización de determinados fermentos o enzimas es fundamental a la hora de promover la liberación de ciertos péptidos. A pesar de estas diferencias, existen regiones de las proteínas lácteas que presentan una gran homología entre distintas especies. Se ha postulado que la presencia de determinados péptidos bioactivos en estas regiones no es casual y que podría tener un significado fisiológico (Kohmura y col., 1989).

### ***Leches fermentadas como alimentos funcionales***

El yogurt y las leches fermentadas presentan una serie de propiedades beneficiosas para la salud que permiten considerarlos como alimentos funcionales, a la vez que contienen multitud de ingredientes funcionales para la formulación de otros alimentos. Además, estos productos lácteos son un vehículo excelente para la inclusión de otros ingredientes funcionales de origen lácteo o no lácteo, como por ejemplo bacterias probióticas,

carbohidratos prebióticos, fibra alimentaria, compuestos antioxidantes, etc. (Recio y López-Fandiño, 2005).

Las propiedades beneficiosas de las leches fermentadas se pueden atribuir a los microorganismos que se emplean en su elaboración y a los diferentes productos liberados durante el proceso de fermentación, tales como metabolitos microbianos, iones y moléculas biológicamente activas. Los microorganismos contribuyen a la seguridad e inocuidad del producto y le confieren una serie de características desde el punto de vista organoléptico, tecnológico y nutricional. Además de aumentar la biodisponibilidad de la lactosa y de las proteínas y de producir un enriquecimiento en ciertas vitaminas del grupo B, determinados microorganismos, en particular algunas bacterias ácido lácticas como lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos, presentan efectos probióticos en el organismo de los consumidores (Leroy y De Vuyst, 2004).

Las fermentaciones con bacterias ácido lácticas se hallan a veces asociadas a fermentaciones con otro tipo de microorganismos, tales como levaduras y mohos.

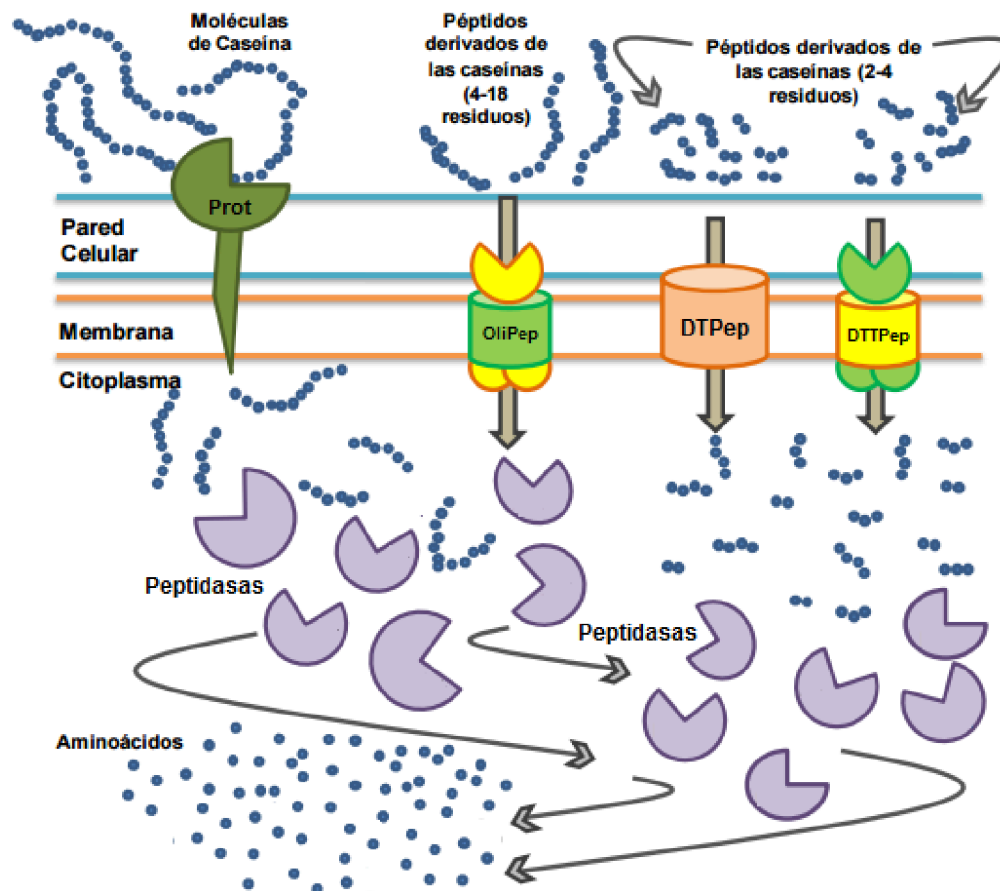
Las bacterias ácido lácticas tienen la capacidad de obtener energía de la lactosa y de hidrolizar las proteínas lácteas liberando péptidos y aminoácidos al medio. Su capacidad proteolítica ha sido tradicionalmente explotada porque los aminoácidos y péptidos que se forman durante la fermentación contribuyen o son precursores de otras sustancias que influyen en el aroma, el sabor y la textura de estos productos (Visser, 1993).

El sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas es muy complejo y bastante específico, e implica la acción concertada de proteinasas y peptidasas en la hidrólisis de las proteínas lácteas hasta el nivel de aminoácidos (Figura 3). Las funciones que desempeñan los componentes del sistema proteolítico se pueden dividir en tres grupos (Thomas y Pritchard, 1987): 1) una proteinasa extracelular unida a la membrana plasmática que cataliza la formación de oligopéptidos por degradación directa de la caseína; 2) en la membrana de las bacterias lácticas existen sistemas de transporte específicos para aminoácidos, di- y tri-péptidos, y oligopéptidos de hasta 18 residuos, que regulan su pasaje a través de la membrana celular; 3) un sistema de distintas peptidasas intracelulares son las responsables últimas de la degradación de los péptidos más largos que se transportan al interior de la célula.

En los últimos años se ha visto que los sistemas proteolíticos de ciertas bacterias son capaces de liberar al medio péptidos bioactivos a partir de las proteínas lácteas (Gobbetti y col., 2002).

Los péptidos bioactivos pueden ejercer sus funciones mediante diversos mecanismos. Algunos actúan uniéndose a determinados receptores, otros son inhibidores de enzimas, otros regulan la absorción intestinal, etc. Además, los péptidos derivados de proteínas alimentarias, a diferencia de los péptidos bioactivos endógenos, pueden presentar propiedades multifuncionales. Este es el caso del péptido  $\beta$ -lactorfina, cuya secuencia es YLLF, derivado de la  $\beta$ -lactoglobulina, que posee actividad opiácea y además presenta actividad inhibitoria de la ECA (Mullally y col., 1996).

A partir de productos lácteos fermentados se han aislado numerosos péptidos o precursores de los mismos, así como fracciones peptídicas con propiedades bioactivas. Se han descrito péptidos con actividad inmunomodulante (LeBlanc y col., 2002), anticancerígena (LeBlanc y col., 2005), hipocolesterolémica (Kawase y col., 2000), antimicrobiana (Hernández-Ledesma y col., 2005), quelante de minerales (Lorenzen y Meisel, 2005), opiácea (Rokka y col., 1997), antioxidante (Hernández-Ledesma y col., 2005), etc. De todos éstos, los péptidos bioactivos que han sido más estudiados hasta el momento son aquellos implicados en el control de la presión arterial.

**Figura 3:** Sistema proteolítico de *Lactococcus lactis*

Modelo del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis*. Está compuesto por una proteínasa (Prot), por el sistema de transporte para péptidos a través de la membrana citoplasmática (OliPep para oligopéptidos, DT Pep para di y tripéptidos y DTT Pep para di, tri y tetrapéptidos) y por diferentes peptidasas (adaptado de Pinto y col., 2012).

### **Actividades biológicas de los péptidos lácteos**

#### *Actividad opiácea*

El estudio de la actividad opiácea en un hidrolizado de proteínas lácteas dio lugar al nacimiento del concepto de exorfina, o péptido opiáceo de origen dietético, en contraposición al de endorfina o péptido endógeno.

Como agonistas opiáceos se incluyen los derivados de caseína, como las  $\beta$ -casamorfina, fragmentos incluidos en la zona f (60-70) de la  $\beta$ -CN y ligandos

de los receptores  $\mu$  (Trompette y col., 2003), y las exorfinas, fragmentos procedentes de la  $\alpha_{S1}$ -CN (Loukas y col., 1983) y ligandos de los receptores  $\delta$ . La  $\alpha$ -lactorfina, que corresponde al fragmento f (50-53), la  $\beta$ -lactorfina, fragmento f (102-105) y la serorfina, fragmento f (399-404), son agonistas de los receptores opiáceos  $\mu$ , derivados de la  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La), la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) y la seroalbúmina (BSA), respectivamente (Shah, 2000). Tras ser ingeridos en el alimento o tras liberarse durante la digestión gastrointestinal, las  $\beta$ -casamorfina pueden ejercer sus efectos a nivel local, que sólo se han descrito en animales adultos. Se ha estudiado la reducción del grado de vaciamiento gástrico y de la motilidad intestinal en ratas (Mihatsch y col., 2005) y el efecto antisecretorio en el íleon de conejo (Tomé y col., 1987). En humanos se han detectado fragmentos opiáceos en el contenido intestinal tras la ingestión de leche de vaca (Sienkiewicz-Szlapka y col., 2009), no detectándose en el suero sanguíneo. Aunados a estos estudios, se han realizado otros donde se ha informado la presencia de péptidos opioides en el intestino de infantes, después de la ingesta de leche (Kost y col., 2009), y estudios encaminados a la simulación del proceso de digestión de fórmulas lácteas infantiles (De-Noni, 2008). La confirmación en el hombre de los efectos encontrados en los animales de experimentación abriría un nuevo campo de aplicación de estos péptidos opiáceos en la prevención y el tratamiento de desórdenes intestinales. Los péptidos antagonistas opiáceos suprimen la actividad agonista de las encefalinas, produciendo el mismo efecto que la naloxona (Hartmann y Meisel, 2007). Este grupo de péptidos incluye las casoxinas, procedentes de la  $\kappa$ -CN y de la  $\alpha_{S1}$ -CN (Fosset y Tomé, 2001), ligandos de los receptores  $\mu$  con baja actividad comparada con la de la naloxona y los receptores  $\mu$  con moderada actividad.

### *Actividad antitrombótica*

Secuencias peptídicas de la  $\kappa$ -CN, denominadas casoplatelinas, son similares a la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno humano (Clare y Swaisgood, 2000). Se ha comprobado *in vitro* que los péptidos derivados del extremo carboxilo terminal de la  $\kappa$ -CN bovina, y fundamentalmente el fragmento f(106-116), son inhibidores de la agregación plaquetaria y de la unión de la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno humano al receptor específico de la membrana de las plaquetas

(Jollès y col., 1986; Hartmann y Meisel, 2007). La característica estructural similar entre la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno y las casoplatelinas, responsables de la competencia en el proceso de agregación de las plaquetas, es la homología en la secuencia de los aminoácidos isoleucina, lisina y asparagina en las posiciones 108, 112 y 115, respectivamente (Shah, 2000).

La actividad antitrombótica ejercida por el fragmento Lys-Arg-Asp-Ser, derivado de la lactoferrina, se debe a otro mecanismo de acción, ya que inhibe de manera dosis-dependiente la agregación plaquetaria inducida por el difosfato de adenosina (ADP), debido a la homología con el fragmento f(572-575) de la cadena  $\alpha$  del fibrinógeno (Mazoyer y col., 1990). Se ha comprobado *in vivo* que este fragmento inhibe la formación de trombos en la arteria coronaria de perros (Shebuski y col., 1989) y prolonga el tiempo de sangrado en la arteria mesentérica del hámster (Cook y col., 1988). Además se ha descrito el efecto antitrombótico de este péptido sobre la trombosis inducida por láser en rata y cerdo (Drouet y col., 1990). Actualmente, se han realizado estudios de aislamiento de este fragmento, en leches fermentadas y se han discutido ampliamente sus funciones y usos (Phelan y Kenns, 2011).

Se han encontrado secuencias peptídicas en el plasma de recién nacidos alimentados con leche materna o con fórmulas maternizadas elaboradas con leche de vaca, en concentración suficiente para ejercer el efecto antitrombótico *in vivo*, lo que demuestra su liberación a partir de las proteínas lácteas durante el proceso de digestión gastrointestinal (Chabance y col., 1995; Severin y Wenshui, 2005).

Por otra parte, se ha demostrado la presencia de péptidos antitrombóticos en el estómago, duodeno y posteriormente en la sangre de adultos que habían ingerido leche o yogurt (Chabance y col., 1998; Silva y Malcata, 2005). Esto demuestra la capacidad de las bacterias lácticas de hidrolizar las proteínas lácteas y formar péptidos bioactivos durante el proceso de fermentación, así como la capacidad del tracto gastrointestinal de absorber cadenas peptídicas.

### *Actividad inmunomodulatoria*

Los péptidos responsables de esta actividad son fragmentos derivados de la  $\alpha_{S1}$ -CN, de la  $\beta$ -CN, de la  $\kappa$ -CN (Silva y Malcata, 2005) y de la  $\alpha$ -La (Kayser y Meisel, 1996; Korhonen y Philanto-Lepälä, 2006). El mecanismo de acción de

estos péptidos no es conocido, aunque la hipótesis más aceptada describe la unión a receptores opiáceos situados en la membrana de los linfocitos, lo que influye en su actividad inmunoreactiva. Se ha identificado el aminoácido arginina de los extremos amino o carboxilo terminal como la zona reconocida por los receptores específicos de la membrana de los linfocitos y los macrófagos (Kayser y Meisel, 1996; Chan y col., 2006). Se ha visto que el péptido tirosina-glicina (Tyr-Gly), que corresponde a los fragmentos f(18-19) y f(50-51) de la  $\alpha$ -La, el fragmento f(38-39) de la  $\kappa$ -CN y el péptido Tyr-Gly-Gly, que corresponde al fragmento f(18-20) de la  $\alpha$ -La, modulan la producción de linfoquinas *in vitro* (Kayser y Meisel, 1996). Por esta razón es que se los ha empleado en la inmunoterapia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (SIDA), ya que reducen notablemente el progreso hacia la fase clínicamente relevante de la enfermedad (Rutherford-Markwick y Moughan, 2005).

La isracidina, fragmento f(1-23) de la  $\alpha_{S1}$ -CN, permite el desarrollo de inmunidad a largo plazo frente a la reinfección por *Staphylococcus aureus* (Meisel, 2004).

Los efectos de estos péptidos se han comprobado tras la administración intravenosa de los mismos, pero no existen en la actualidad estudios concluyentes sobre los efectos inmunomodulatorios ejercidos luego de su ingesta.

### *Actividad antimicrobiana*

La inhibición *in vitro* del crecimiento de cepas patógenas tiene lugar por la acción de fragmentos de caseína y de la lactoferrina. El efecto antimicrobiano de los péptidos derivados de las proteínas lácteas parece estar relacionado con la carga neta positiva de estos péptidos. Un gran porcentaje de los aminoácidos constituyentes son básicos, y entre ellos forman un bucle en forma de  $\alpha$ -hélice en el extremo carboxilo terminal (Kang y col., 1996; Sato y Feix, 2006), que provoca la formación de canales iónicos en la membrana de los microorganismos, alternando su permeabilidad y provocando la muerte celular (Clare y col., 2003).

El fragmento f(1-23) de la  $\alpha_{S1}$ -CN o isracidina, obtenido tras la hidrólisis por la quimosina, ejerce *in vivo* actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus*

*aureus* y *Candida albicans*, a concentraciones comparables con la de antibióticos conocidos (Lahov y Regelson, 1996; Haque y Chand, 2008). Además se han descrito con actividad antimicrobiana distintos fragmentos derivados de la  $\alpha_{S2}$ -CN, como la casocidina-I o fragmento f(165-203), que inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus carnosus* (Zucht y col., 1995; Gobetti y col., 2004). Las secuencias peptídicas f(164-179) y f(183-207), aisladas a partir de un hidrolizado con pepsina de la  $\alpha_{S2}$ -CN, inhiben el crecimiento de *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* (Zucht y col., 2001); McCann y col., 2005). La lactoferrina, fragmento f(17-41), aislada de un hidrolizado con pepsina, presenta propiedades antibacterianas *in vitro* frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Streptococcus* y levaduras como *Candida* (Steijns y Hooijdonk, 2000). El tamaño reducido de este péptido respecto al de la lactoferrina, favorece su acceso a las zonas de acción en la superficie microbiana.

Los efectos *in vivo* de estos péptidos se han demostrado tras su administración por vía intravenosa.

### *Péptidos quelantes de minerales*

Los caseinofosfopéptidos son fragmentos derivados de la  $\alpha_{S1}$ -CN,  $\alpha_{S2}$ -CN y  $\beta$ -CN. La mayoría de estos péptidos posee una secuencia con tres grupos fosfoserina, seguida de dos glutámicos. Las cadenas laterales negativas, en particular la de los grupos fosfato, son las responsables de la unión de los minerales, especialmente del calcio (Meisel y FitzGerald, 2003). Además, las secuencias próximas a los grupos fosforilados determinan las diferencias en la actividad quelante del calcio de los distintos caseinofosfopéptidos (Schlimme y Meisel, 1995).

Estos péptidos ejercen efectos en la absorción del calcio y de otros elementos traza en el intestino, además de inhibir la formación de caries mediante la recalcificación dental (Clare y Swaisgood, 2000).



### *Actividad antihipertensiva*

La hipertensión arterial es un proceso multifactorial. La inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) es el mecanismo de acción más estudiado para el control de esta patología. En proteínas de origen animal, la actividad inhibitoria de la ECA se ha determinado en hidrolizados de gelatina bovina (Kim y col., 2001), de músculo de sardina (Matsufuji y col., 1994; Osajima y col. 1994), de bonito (Matsumura y col., 1993) o de atún (Kohama y col., 1988; Kohama y col., 1991) y en hidrolizados de músculo de gallina (Fujita y col., 2000). También se han obtenido a partir de proteínas vegetales aisladas y purificadas, como la  $\alpha$ - y la  $\gamma$ -zeína. Las proteínas de origen animal más estudiadas como fuente de péptidos inhibidores de la ECA son las proteínas lácteas, principalmente caseína (Silva y Malcata, 2005). Tales péptidos derivados de las proteínas de la leche pueden ser obtenidos por hidrólisis enzimática o por fermentación de la leche, o por ambos procesos.

La liberación de péptidos bioactivos a partir de proteínas de la leche se ha llevado a cabo por hidrólisis de estas últimas, empleando un gran número de enzimas de origen animal, vegetal y microbiano. El aislamiento y caracterización de péptidos bioactivos se ha realizado fundamentalmente a partir de digeridos *in vitro* de proteínas lácteas (Pihlanto-Lepälä y col., 2000; Wu y Ding, 2001; Vermeirssen y col., 2004; Saito, 2008). Para ello se han empleado las enzimas responsables de la digestión gastrointestinal, tales como pepsina, tripsina y quimotripsina pancreática. La estructura abierta y flexible de caseína la hace muy susceptible a la hidrólisis, lo que permite la liberación de un gran número y variedad de péptidos (Yamamoto y Takano, 1999).

Las enzimas microbianas han sido incorporadas de manera satisfactoria en la obtención de péptidos bioactivos. Así, el empleo de las enzimas procedentes de bacterias lácticas como *Lactobacillus helveticus*, han permitido la obtención de péptidos inhibidores de la ECA derivados de caseína. Yamamoto y col. (1994) han empleado para la hidrólisis de caseína una proteinasa asociada a la pared celular de *L. helveticus* CP790. Esta enzima es capaz de hidrolizar la  $\alpha_{S1}$ -CN,  $\alpha_{S2}$ -CN y  $\beta$ -CN. Los péptidos liberados generalmente son de gran tamaño y baja actividad inhibitoria de la ECA. Sólo el fragmento f(43-69) de la  $\beta$ -CN es muy activo, con un valor de CI<sub>50</sub> de 4mmol l<sup>-1</sup> (Yamamoto y col., 1994).

La hidrólisis de las proteínas de suero de leche se ha llevado a cabo con enzimas microbianas de distinto origen, fundamentalmente la proteinasa K y la termolisina. Los hidrolizados obtenidos tras la acción de estas enzimas sobre concentrados de proteínas de suero, presentan porcentajes de inhibición de la ECA superiores al 95 % (Saito y col., 1997). Abubakar y col. (1998) han aislado el péptido IPA a partir de un hidrolizado de un suero de quesería con proteinasa K, correspondiente al fragmento f(78-80) de la  $\beta$ -Lg, con un valor de CI50 de 141 mmol l<sup>-1</sup>.

*L. helveticus* posee mayor actividad proteolítica sobre las proteínas lácteas que otras bacterias lácticas. En consecuencia, el contenido peptídico de la leche fermentada por esta bacteria es mayor (Leclerc y col., 2002). A partir de leche fermentada con *L. helveticus*, Yamamoto y col. (1999) han aislado el péptido de secuencia YP, que puede originarse de la  $\alpha_{S1}$ -CN, la  $\beta$ -CN y/o la  $\kappa$ -CN. Su actividad inhibitoria de la ECA es baja (CI50= 720 mmol l<sup>-1</sup>). También se han aislado otros péptidos inhibidores de la ECA formados a partir de  $\beta$ -CN y  $\kappa$ -CN durante la fermentación de la leche con otras bacterias lácticas tales como: *L. casei* subsp. *rhamnosus* (*Lactobacillus* GG) (Rokka y col., 1997), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. lactis* subsp. *cremoris* (Gobbetti y col., 2000) y *Enterococcus faecalis* (Quirós y col. 2007).

Actualmente, en el aislamiento y la caracterización de péptidos inhibidores de la ECA se están empleando algunas cepas de levaduras capaces de hidrolizar las proteínas lácteas. Así la combinación de *L. helveticus* y *S. cerevisiae* ha permitido la obtención de una bebida fermentada con capacidad inhibitoria frente a ECA (Fitzgerald y Meisel, 2000). A partir de esta leche fermentada se han aislado dos tripéptidos, de secuencia VPP, fragmento f(84-86) de la  $\beta$ -CN e IPP, fragmentos f(74-76) y f(108-110) de la  $\beta$ -CN y la  $\kappa$ -CN, respectivamente (Nakamura y col., 1995). Los valores de CI50 son de 9 mmol l<sup>-1</sup> para el péptido VPP y de 5 mmol l<sup>-1</sup> para el péptido IPP. Estos dos fragmentos no se obtienen por la hidrólisis de caseína con la proteinasa aislada de *L. helveticus*, lo que demuestra la acción de las peptidasas intracelulares durante la fermentación (Yamamoto y Takano, 1999).

En algunos casos y debido al corto tiempo del proceso de fermentación, ha sido necesario llevar a cabo la hidrólisis de la leche o del suero con enzimas digestivas o microbianas, en forma previa al proceso de fermentación en sí mismo. Así, Saito y col. (1997) no observaron cambios en la actividad

inhibitoria de la ECA tras el proceso de fermentación de un suero de quesería hidrolizado con proteinasa K y fermentado posteriormente con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Sin embargo, el suero hidrolizado con pepsina, tripsina y termolisina, fermentado con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, presentó una disminución de la actividad de la ECA. Este descenso puede ser debido al consumo parcial de los péptidos por los microorganismos como fuente de nitrógeno, tras la hidrólisis por las enzimas bacterianas.

Por el contrario, el proceso de fermentación previo a la hidrólisis supone un incremento de la actividad. Así, Rokka y col. (1997) han descrito altos valores de actividad inhibitoria de la ECA en una leche fermentada con *Lactobacillus* GG y posteriormente hidrolizada con tripsina y pepsina. Incluso se han aislado péptidos con actividad inhibitoria de la ECA procedentes de la  $\alpha$ -La y de la  $\beta$ -Lg a partir de un suero fermentado e hidrolizado con una combinación de pepsina y tripsina (Pihlanto-Leppälä y col., 1998). Gobbetti y col. (2000) han demostrado este aumento en la actividad de la enzima en una leche fermentada con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en combinación con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, después de realizar la digestión con tripsina y quimotripsina.

### **HIPERTENSIÓN Y SU RELACIÓN CON LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA**

---

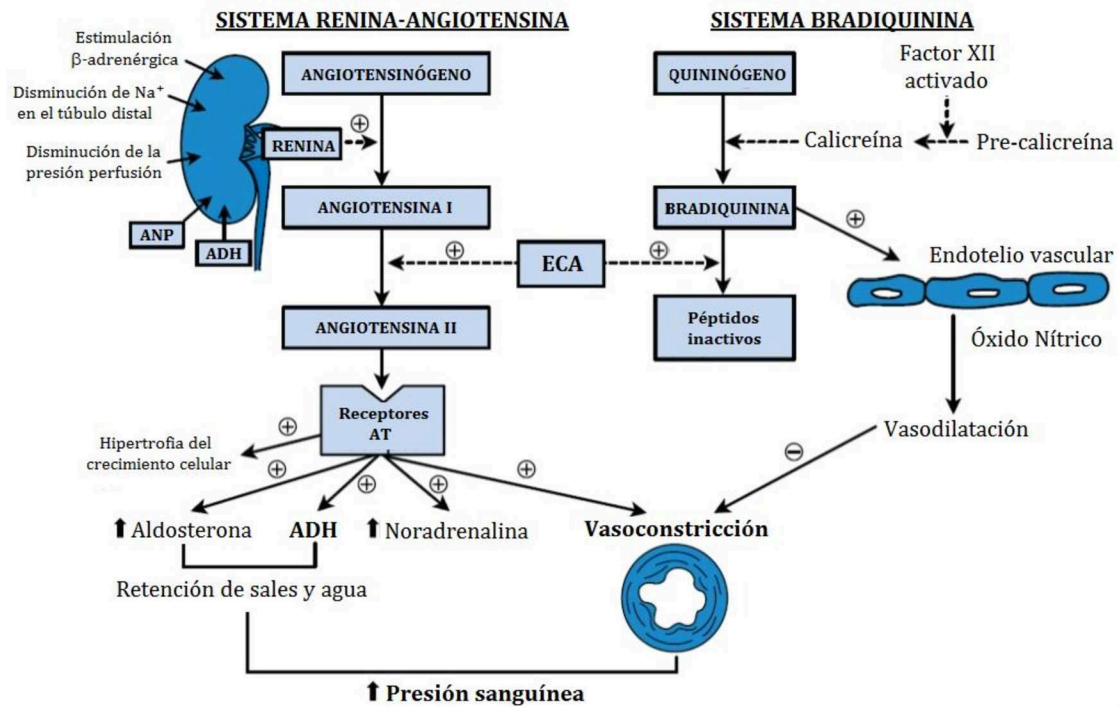
La hipertensión es una de las enfermedades cardiovasculares más comunes a nivel mundial. Datos obtenidos por Kearney y col. (2005) demostraron que más del 25 % de la población adulta, cercana al billón de personas en el mundo, sufren esta patología. La hipertensión es un factor de riesgo para la arteriosclerosis, infarto del miocardio, apoplejía y enfermedades renales en el estado terminal (Kearney y col., 2005). La prevalencia de la hipertensión se incrementa con la edad, afectando aproximadamente al 65 % de la población en países desarrollados, dentro de grupos etarios de 65-74 años (Duprez y col., 2002). La Organización Mundial de la Salud estima que para 2020, las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares habrán superado a las enfermedades infecciosas, para convertirse en la principal causa de muerte y discapacidad en todo el mundo (López y Murray, 1998). Modificaciones en la

dieta y/o en el estilo de vida son dos de las herramientas más importantes comúnmente empleadas de modo eficaz para disminuir la presión sanguínea (Hermansen, 2000). Por lo tanto, cualquier componente alimenticio que tenga la habilidad de disminuir la presión sanguínea en humanos es un potencial candidato para el uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

La enzima convertidora de angiotensina I (ECA, EC: 3.4.15.1) pertenece a una clase de zinc proteasas y está ampliamente distribuida en los tejidos de mamíferos. Predominantemente se encuentra como una ecto-enzima (o enzima extracelular) unida a la membrana en las células del endotelio vascular de los pulmones y de otros órganos tales como cerebro, hígado, riñón, intestino y placenta. También está presente en otros tipos de células, incluyendo células epiteliales, neuroepiteliales y germinales masculinas (Riordan, 2003).

Esta enzima es un factor clave para las terapias cardiovasculares, porque dicha enzima juega un papel fundamental en la regulación de la presión sanguínea, vía el sistema renina-angiotensina. La ECA actúa hidrolizando angiotensina-I, decapeptido inactivo, de secuencia DNVYIHPFHL, producido por la acción de la renina. La hidrólisis conduce a la liberación de angiotensina-II y el dipéptido C-terminal His-Leu (Skeggs y col., 1956). La angiotensina-II es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora. Su acción provoca la contracción rápida de las arteriolas, y por tanto, el incremento de la presión arterial. Además, estimula la secreción de aldosterona por las glándulas suprarrenales, hormona que induce la retención de sodio y agua y la excreción de potasio. La acumulación de agua provoca el incremento del volumen extracelular (Tirelli y col., 1997), el consecuente aumento de la presión arterial y la neutralización de la producción de renina. La ECA actúa simultáneamente en el sistema quinina-caliceína, catalizando la degradación de las bradiquininas (Erdős, 1975; Soffer, 1976), compuestos de potente acción vasodilatadora. Esta acción favorece el incremento de la presión arterial (Figura 4).

**Figura 4:** Sistemas renina-angiotensina y quinina-caliceína. Acción de la enzima convertidora de angiotensina



**ADH:** hormona antidiurética; **ANP:** péptido natriurético auricular, **ECA:** Enzima convertidora de angiotensina (adaptado de Murphy, 2007).

Se ha demostrado que la inhibición de la ECA provoca el descenso de la presión arterial en el hombre y en animales (Laffan y col., 1978). Se han identificado varios péptidos endógenos que actúan como inhibidores y sustratos competitivos de la ECA, como las encefalinas, las bradiquininas y la sustancia P. Como primeros inhibidores exógenos se estudiaron los extractos del veneno de la serpiente *Bothrops jararaca*. Estos extractos presentan un doble efecto: potencian la actividad de la bradiquinina e inhiben la ECA, tanto *in vitro* (Bakhle, 1968) como *in vivo* (Ng-Kwai-Hang y Vane, 1970). A partir de estos extractos se han aislado distintos péptidos (Ferreira y col., 1970; Ondetti y col., 1971). Actualmente, un derivado sintético, el Captopril (D-3-mercaptopropanoil-1-prolina;  $CI_{50} = 0.006 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), obtenido tras el estudio del modelo hipotético del sitio activo de la enzima, es el fármaco más empleado en el control de la hipertensión (Unger y col., 1981; Wyvratt y Patchett, 1985).

La unión de los péptidos a la ECA está influida por la secuencia tripeptídica C-terminal de los mismos, que puede interaccionar con tres regiones del centro activo de la ECA (Ondetti y Cushman, 1982). Así, los aminoácidos de carácter hidrofóbico, como Trp, Tyr, Phe o Pro, favorecen la unión a estas zonas. El péptido con secuencia C-terminal Phe-Ala-Pro, análogo al encontrado en el inhibidor presente en el extracto del veneno de serpiente, es uno de los más favorables para unirse al centro catalítico. La carga positiva del grupo guanidino de la Arg o del grupo  $\epsilon$ -amino de la Lys, contribuyen a la potencia inhibidora (Cheung y col., 1980). La presencia de aminoácidos dicarboxílicos en la secuencia peptídica, o de Pro como penúltimo aminoácido, disminuye o anula la actividad inhibitoria de la ECA (Erdös, 1976; Cushman y col., 1977). El extremo N-terminal también influye en la actividad, y así la presencia de Val o de Ile en esta posición incrementa en el péptido su actividad inhibitoria de la ECA.

Por lo tanto, compuestos inhibidores de la ECA bloquean o reducen la conversión de angiotensina I a II, lo cual reduce el nivel de los agentes vasoconstrictores y por ende, genera una reducción de la presión sanguínea. La inhibición de la actividad de ECA mejora además el nivel de bradiquinina, lo que también ayuda a mantener normal la presión sanguínea.

El desarrollo inicial de inhibidores de la ECA ha sido enfocado en compuestos sintéticos que tienen propiedades fisicoquímicas similares a las del péptido original de veneno de serpiente (Cheung y Cushman, 1973; Cushman y col., 1973). La gestión clínica actual de la hipertensión y de desórdenes metabólicos relacionados, involucra el uso de varias drogas (como captopril, lisinopril, enalaprilat, etc.), que son variantes sintéticas de inhibidores peptídicos naturales de la ECA. Sin embargo, estas drogas provocan efectos secundarios tales como tos y edema angioneurótico, en pacientes sometidos a tratamiento para varias enfermedades cardiovasculares (Israaili y Hall, 1992). Además, tales inhibidores de la ECA no son seguros para mujeres embarazadas (Opie, 1996).

A fin de proporcionar un enfoque alternativo a las terapias de las enfermedades relacionadas con la ECA, en la actualidad los esfuerzos se han enfocado en la búsqueda y desarrollo de agentes hipotensivos de origen natural, tales como compuestos inhibitorios de la ECA derivados de plantas

y/o alimentos, que son más seguros y baratos (aunque menos activos) que las drogas sintéticas.

## **ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. PAPEL DE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA**

---

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurológico que provoca la muerte de las células nerviosas del cerebro. Por lo general, la EA comienza paulatinamente y sus primeros síntomas pueden atribuirse a la vejez o al olvido común. A medida que avanza la enfermedad se van deteriorando las capacidades cognitivas, entre ellas la capacidad para tomar decisiones y llevar a cabo las tareas cotidianas, y pueden surgir modificaciones de la personalidad, así como conductas problemáticas. En sus etapas avanzadas, la EA conduce a la demencia y finalmente a la muerte. La demencia se define como el deterioro adquirido en las capacidades cognitivas que entorpece la realización satisfactoria de actividades de la vida diaria (Flint Beal y col., 1998). El Alzheimer es una demencia progresiva que tiene al déficit de memoria como uno de sus síntomas más tempranos y pronunciados. Por lo general, el paciente empeora progresivamente, mostrando problemas perceptivos, del lenguaje y emocionales a medida que la enfermedad va avanzando (Berciano Blanco, 2006). La EA se ha convertido en un problema social muy grave para millones de familias y para los sistemas nacionales de salud de todo el mundo. Es una causa importante de muerte en los países desarrollados, por detrás de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Sin embargo, lo que hace que esta demencia tenga un impacto tan fuerte en el sistema sanitario y en el conjunto de la sociedad es, sin duda alguna, su carácter irreversible, la falta de un tratamiento curativo y la carga que representa para la familia de los afectados (Kettl, 2007). La enfermedad suele tener una duración media aproximada de 10-12 años, aunque ello puede variar mucho de un paciente a otro (Berciano Blanco, 2006). El Mal de Alzheimer es la demencia más frecuente en la población anciana, representando un 50 al 60 % de las demencias. Se calcula que en el mundo hay más de 35 millones de personas que la sufren. Según la Asociación de Alzheimer Internacional, la enfermedad puede comenzar a una edad tan temprana como los 50 años (Eisendrath y Lichtmacher, 2006), aunque la

posibilidad de cada individuo de padecer de Alzheimer aumenta con la edad. La incidencia de la enfermedad se duplica cada 5 años después de los 65 años de edad. La EA no es necesariamente el resultado de envejecimiento (den Dunnen y col., 2008); sin embargo, las probabilidades de recibir el diagnóstico de la EA después de los 85 años de edad superan a uno de cada tres individuos.

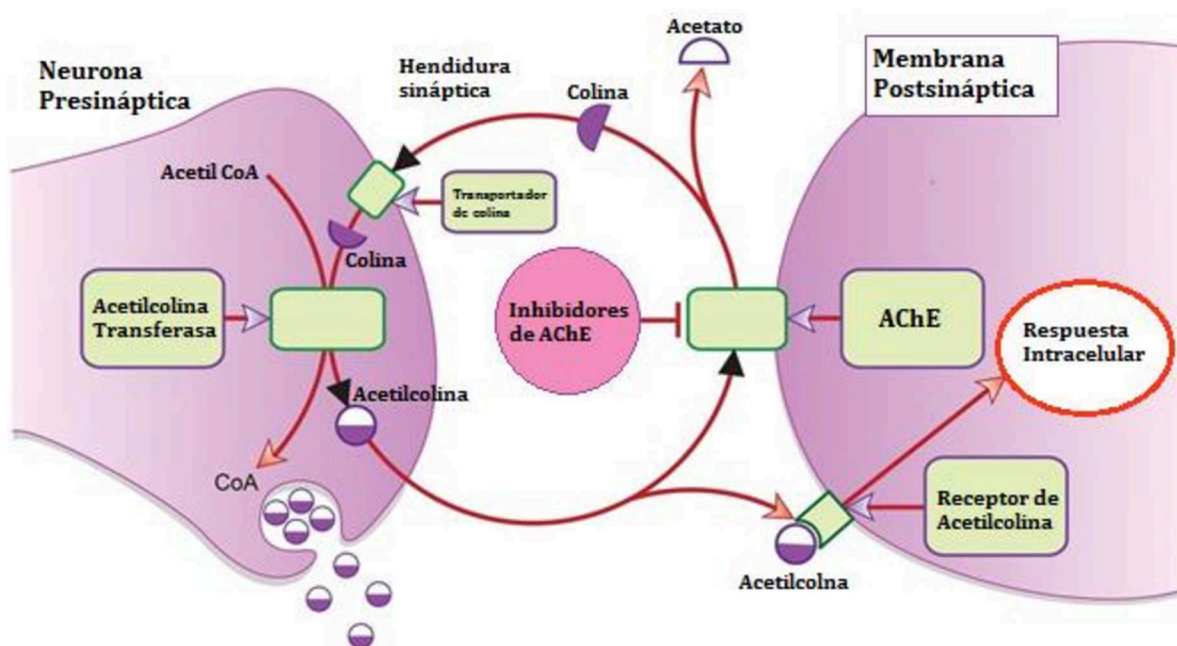
Existe una estrecha correlación entre el grado de demencia y la densidad de placas seniles y de neuronas con degeneración neurofibrilar (Behrens y Vergara, 2007). El tejido cerebral muestra "nudos neurofibrilares" (fragmentos enrollados de proteína dentro de las neuronas, que las obstruyen), "placas neuríticas" (aglomeraciones anormales de células nerviosas muertas y que están muriendo, otras células cerebrales y proteínas) y "placas seniles" (áreas donde se han acumulado productos de neuronas muertas alrededor de proteínas). Aunque estos cambios ocurren en cierto grado en todos los cerebros con la edad, se presentan mucho más en los cerebros de las personas con enfermedad de Alzheimer (Kantor, 2007).

El tratamiento se basa sobre todo en intentar mejorar la calidad de vida del enfermo y retrasar el progreso de la enfermedad. Ciertas vitaminas ayudan al mantenimiento de las funciones cognitivas en estos pacientes, tales como vitaminas B12, B6, ácido fólico (Mahendra, 2004; Luchsinger, 2004). También se ha probado la eficacia de fármacos anti-acetilcolinesterásicos que tienen una acción inhibitoria frente a la enzima acetilcolinesterasa (AChE). AChE (E.C.: 3.1.1.7) es una proteína tetramérica, cuyo sitio activo incluye un grupo hidroxilo de un residuo de serina que realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico de la acetilcolina, reacción que transcurre a través de un estado de transición tetrahédrico dando como producto intermediario acetilserina- AChE y la liberación de colina (Rhee y col., 2001). La acetilserina de la AChE posteriormente se hidroliza liberando acetato. Esta enzima regula la transmisión del impulso nervioso en la sinapsis colinérgica mediante la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh) a ácido acético y colina (Figura 5) (Keane y Ryan, 1999). El sitio activo de la AChE contiene una tríada catalizadora que consiste en Ser 200, His 440 y Glu 327, la cual es similar a la tripsina y a otras proteasas de serina. Sin embargo, la tríada de la AChE tiene la estereoquímica opuesta a la de tripsina y contiene Glu en lugar de Asp de la



tripsina. La AChE es una de las enzimas más eficaces, ya que hidroliza 5000 moléculas de ACh/molécula de enzima/seg (Kraut y col., 2000).

**Figura 5:** Inhibidores de acetilcolinesterasa (IACHe) en la transmisión colinérgica nerviosa



Acetilcolina es producida en la neurona pre-sináptica por la enzima colinacetiltransferasa, a partir de acetil-coenzima A y colina, y luego es liberada en la hendidura sináptica, donde se une a los receptores de acetilcolina en la membrana post-sináptica, desencadenando una respuesta intracelular. La enzima acetilcolinesterasa hidroliza acetilcolina en acetato y colina en orden para finalizar la transmisión sináptica. Colina es transportada dentro de la membrana pre-sináptica por un transportador de colina y sirve como sustrato para la producción descrita de acetilcolina. IACHe inhiben a la enzima acetilcolinesterasa, lo que a su vez inhibe la ruptura de acetilcolina en acetato y colina y prolonga su duración de acción (adaptado de Jeger, 2013).

Aunque los factores de iniciación que sustentan esta patología aún restan ser elucidados, está bien establecido que la EA está asociada con una reducción de los niveles de ACh, el cual es el mayor neurotransmisor en el sistema nervioso central (Singh, 2003). De acuerdo a la hipótesis colinérgica, la

restauración de los niveles de ACh, los cuales son progresivamente perdidos durante el progreso de la EA, retrasan la pérdida de la función cognitiva (Filho y col., 2006). Estudios recientes han mostrado que inhibidores de AChE alivian los síntomas neuropsiquiátricos en pacientes con EA, y proveen efectos beneficiosos en la capacidad cognitiva incrementando los niveles de ACh dentro de la región sináptica (Zarotsky y col., 2003). La inhibición de AChE sirve también como una estrategia para el tratamiento de otros desórdenes neurológicos tales como demencia senil, ataxia, miastenia gravis y enfermedad de Parkinson (Pulok y col., 2007). En este campo, las investigaciones han logrado los mayores avances terapéuticos en el tratamiento de la EA mediante la inhibición de la AChE (Singh, 2003; Sramek y col., 2002) y por ende, se ha mejorado el comportamiento del enfermo en cuanto a la apatía, la iniciativa y la capacidad funcional y las alucinaciones, mejorando su calidad de vida. El primer fármaco anticolinesterásico comercializado fue la tacrina, hoy no empleada por su hepatotoxicidad. Existen otros fármacos disponibles como por ejemplo: donepezilo, rivastigmina y galantamina. Presentan un perfil de eficacia similar con parecidos efectos secundarios: alteraciones gastrointestinales, anorexia y trastornos del ritmo cardiaco (Rodríguez y Guerra Hernández, 2007; Kantor, 2007). En la actualidad la búsqueda de otros inhibidores de esta enzima se ha intensificado notablemente. Muchos investigadores esperan encontrar compuestos activos en plantas o en alimentos para reemplazar total o parcialmente a dichos medicamentos (Mukherjee y col., 2007). Recientemente, Okello y col. (2004) encontraron que extractos acuosos de té verde, té negro y café mostraron buena actividad contra AChE. Además, Custódio y col. (2012) encontraron actividad anti-acetilcolinesterasa en extractos orgánicos de microalgas, y Ahn y col. (2010) obtuvieron hidrolizados peptídicos a partir de hígado de atún con similar actividad. Esto abre un camino muy poco explorado, relativo al estudio de propiedades anticolinesterásicas de productos naturales.

## ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA

---

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) son aquellas que se atribuyen a un alimento específico, a una sustancia que se le ha incorporado o a su contaminación a través de recipientes mientras se prepara o distribuye. Las enfermedades de transmisión alimentaria abarcan un amplio espectro de dolencias y constituyen un problema de salud pública creciente en todo el mundo. Se deben a la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos, por toxinas microbianas o por sustancias químicas. La contaminación de los alimentos puede producirse en cualquier etapa del proceso que va desde la producción al consumo, y puede deberse a la contaminación ambiental, ya sea del agua, la tierra o el aire.

La manifestación clínica más común de una enfermedad transmitida por alimentos consiste en la aparición de síntomas gastrointestinales, pero estas enfermedades también pueden dar lugar a síntomas neurológicos, ginecológicos, inmunológicos y de otro tipo. La ingestión de alimentos contaminados puede provocar una insuficiencia multi-orgánica, incluso enfermedades oncológicas, por lo que representa una carga considerable de discapacidad, así como de mortalidad.

Estas enfermedades constituyen uno de los problemas sanitarios crecientes de mayor impacto sobre la salud de las personas en todo el mundo. Afectan principalmente a la población vulnerable (bebés, niños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos) y traen consigo perjuicios, no sólo para la salud humana, sino también para el comercio, el turismo y el sector agroindustrial. La OMS calcula que más de dos millones de personas mueren cada año a causa de enfermedades diarreicas, muchas de las cuales se adquieren al ingerir alimentos contaminados (Global Foodborne Infections Network (GFN) Strategic Plan 2011-2015.WHO [http://www.who.int/gfn/publications/gfn\\_strategic\\_plan\\_2011-2015.pdf](http://www.who.int/gfn/publications/gfn_strategic_plan_2011-2015.pdf)).

Se estima que hay cerca de 48 millones de casos de enfermedades transmitidas por los alimentos anualmente, lo que equivale a que 1 de cada 6 tan solo en los Estados Unidos se enfermen cada año. Anualmente, estas enfermedades provocan 128.000 hospitalizaciones y 3.000 muertes (Scallan y col., 2011). Según los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la

Alimentación y la Agricultura (FAO) y la OMS, se estima que, en la región latinoamericana, enfermedades provocadas por los alimentos o el agua, causaron unas 57.000 muertes en 2004 (FAO/OMS. World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nation. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Technical report. Microbiological risk assessment series 5. Rome, Italy. 2004. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/y5394e/y5394e.pdf>)

El control de patógenos microbianos, el incremento de la resistencia bacteriana a antibióticos comerciales y la restricción en el uso de conservantes químicos en los alimentos, constituyen en conjunto una preocupación importante en la actualidad. Esta situación ha estimulado en gran medida la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos naturales, que posean un amplio espectro de actividad inhibitoria. Además, una amplia variedad de métodos han sido empleados para prevenir el crecimiento de bacterias patógenas en los alimentos, incluyendo el uso de agentes antimicrobianos sintéticos y naturales. Compuestos como lactoferrina, lisozima, bacteriocinas, monolaurina, EDTA y ácido láctico han sido evaluados, lográndose un grado variable de éxito en el control de bacterias patógenas en los alimentos (Panitee y Vanee, 2007).

Desde que el primer péptido antimicrobiano, obtenido de la polilla cecropia (*Hyatophora cecropia*), fue identificado (Steiner y col., 1981), una variedad de péptidos antimicrobianos (PAs) han sido detectados a partir de numerosos orígenes, tales como plantas, animales, insectos y microorganismos (Broekaert y col., 1995; Mkrtchyan y col., 2010; Rajanbabu y Chen, 2011). Muchos de estos PAs han demostrado poseer un amplio espectro de acción antibacteriana, incluyendo a especies alterantes de los alimentos o causantes de ETAs, tales como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium sporogenes*, etc.

La digestión enzimática de proteínas también genera PAs. De hecho, muchos PAs, incluyendo casecinas, isracidina y casocidina I, fueron inicialmente aislados de hidrolizados de caseína bovina (Hill y col., 1974; Jones y Simms, 1930; Zucht y col., 1995). Aunque los PAs son principalmente generados desde hidrolizados de proteínas de leche, otros tipos de proteínas, luego de

una hidrólisis, tienen la potencial capacidad de liberar nuevos PAs o de aumentar sus bioactividades, si se los compara con su forma intacta o nativa (Liu y col., 2008; Mine y col., 2004; Pellegrini y col., 2004). Song y col. (2012) obtuvieron una fracción de PAs a partir de hidrolizados de proteínas de pescado (*Setipinna taty*) tratados con la enzima pepsina activos frente a una cepa de *Escherichia coli*. Extractos de gelatina de atún y de calamar hidrolizados con la enzima alcalasa generaron diferentes péptidos con actividad antimicrobiana frente a diversas cepas patogénicas de bacterias Gram (+) y Gram (-) (Gómez-Guillén y col., 2010). También se obtuvieron PAs a partir de hidrolizados de proteínas de girasol (Taha y col., 2013), de semillas de palmera (Tan y col., 2012) o de hemoglobina (Yaba Adje y col., 2011). Por lo tanto, la digestión de proteínas para liberar PAs puede abrir una nueva manera de producir compuestos antimicrobianos a gran escala (Bolscher y col., 2006). Estos compuestos pueden ser candidatos promisorios para ser incorporados a sistemas alimentarios, con el objeto de controlar el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes. Esta propuesta tiene su principal justificación en que generalmente los PAs obtenidos presentan un amplio espectro antimicrobiano, como así también en que, en la mayoría de los casos, son inocuos para los consumidores.



# **OBJETIVOS**

## **OBJETIVOS GENERALES**


---

- Aprovechar la existencia de una numerosa colección de bacterias lácticas y levaduras, obtenida a partir de distintos ecosistemas alimentarios de diferentes regiones del país, para realizar un exhaustivo estudio de su capacidad para generar proteínas y péptidos con actividades biológicas de interés para la formulación de alimentos funcionales y para el aseguramiento de la salud humana.
- Lograr, mediante el uso de herramientas biotecnológicas de gran interés actual, alimentos más seguros y saludables, conservados naturalmente e innovativos en cuanto a sus propiedades funcionales.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

---

- Evaluar la capacidad de las cepas de bacterias ácido lácticas integrantes de la colección para producir, al ser propagadas en soluciones de caseína de leche y del sustrato comercial NZ-Case Plus, péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (antihipertensivos) o de la acetilcolinesterasa (prevención y tratamiento del Alzheimer), así como péptidos antibacterianos.
- Evaluar la capacidad de las cepas de levaduras de la colección para generar manoproteínas.
- Determinar las propiedades bioactivas de esas manoproteínas o de los péptidos obtenidos de ellas por hidrólisis enzimática, tales como su capacidad antimicrobiana y su aptitud como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y de la acetilcolinesterasa.
- Desarrollar y optimizar protocolos para el aislamiento, la purificación y la caracterización de péptidos antibacterianos, antihipertensivos y anticolinesterásicos de origen microbiano.



**MATERIALES**  
**Y**  
**MÉTODOS**



## MICROORGANISMOS

---

### **Levaduras**

Se emplearon las siguientes cepas de levaduras, aisladas de productos alimentarios de las regiones santafesina y patagónica: *Saccharomyces cerevisiae* DBFIQ L2, *Candida blankii* LTW7, *Candida famata* DBFIQ L17, *Brettanomyces intermedius* DBFIQ L12, *Pichia anomala* LTW6, *Candida krusei* DBFIQ 1, *Candida famata* DBFIQ 24, *Bretanomyces custersii* DBFIQ 13, *Cryptococcus albidus* DBFIQ 8, *Candida incomunis* LTW1, *Dipodascus macrosporus* LTW4, *Candida blankii* LTW9, *Candida inconspicua* LTW11, *Candida bertae* LTW14 y *Cryptococcus neoformans* LTW3. Todas estas cepas pertenecen a la colección propia de las Cátedras de Microbiología y Biotecnología, Dto. de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ingeniería Química (FIQ), Universidad Nacional del Litoral (UNL).

### **Bacterias ácido lácticas**

Se emplearon las siguientes cepas de bacterias ácido lácticas (BAL), aisladas de leche y productos lácteos provenientes de la región santafesina: *Enterococcus faecalis* DBFIQ E24, *Enterococcus faecium* ETW4, *Lactobacillus dellbrueckii* subsp. *bulgaricus* DBFIQ LB92, *Lactobacillus helveticus* DBFIQ LH 303 y *Lactobacillus plantarum* DBFIQ LP31. Todas las cepas de BAL pertenecen a la colección propia de las Cátedras de Microbiología y Biotecnología, Dto. de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ingeniería Química (FIQ), Universidad Nacional del Litoral (UNL).

### **Conservación de los microorganismos**

Las cepas de levaduras fueron activadas en caldo extracto de malta-extracto de levadura (caldo YM) (Tabla 2), a 30 °C, mediante tres resiembras sucesivas e incubaciones por períodos de 48 horas. Luego de la tercera resiembra, a 5 ml de cada cultivo se los centrifugó durante 15 minutos a 3000 x g y se descartó el sobrenadante en condiciones de esterilidad. A continuación se re-suspendieron las células en 5 ml de agua MilliQ estéril y se centrifugó durante

15 minutos a 3000 x g, descartando nuevamente el sobrenadante en condiciones de esterilidad. Este proceso se repitió dos veces. Por otro lado, se preparó caldo YM con 15 % (v/v) de glicerol estéril. Se re-suspendieron las células en 5 ml de este medio y se distribuyeron en crioviales estériles, dispensando 2,5 ml de la suspensión en cada criovial y almacenándolos a -20 y -80 °C.

**Tabla 2:** Composición del caldo YM

Caldo extracto de malta-extracto de levadura	
<i>Componentes</i>	<i>Cantidad</i>
Extracto de malta	3 g
Extracto de levadura	3 g
Peptona de caseína	5 g
Glucosa	10 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

c.s.p.: cantidad suficiente para.

Las cepas de *Lactobacillus* fueron activadas en Caldo M.R.S. (Biokar) y las de *Enterococcus* en Caldo M17 (Biokar), a 37 °C, mediante tres resiembras sucesivas e incubaciones por períodos de 24 horas. Luego de la tercera resiembra, a 5 ml de cada cultivo se los centrifugó durante 15 minutos a 3000 x g y se descartó el sobrenadante en condiciones de esterilidad. A continuación, se re-suspendieron las células en 5 ml de agua MilliQ estéril y se centrifugó durante 15 minutos a 3000 x g, descartando nuevamente el sobrenadante en condiciones de esterilidad. Este proceso se repitió dos veces. Por otro lado, se preparó Caldo MRS (Biokar) y Caldo M17 (Biokar) con el agregado de un 15 % (v/v) de glicerol estéril. Se re-suspendieron las células en 5 ml del medio correspondiente y se distribuyeron en crioviales estériles, dispensando 2,5 ml de la suspensión en cada criovial y almacenándolos a -20 y -80 °C.

## **HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS (HP) A PARTIR DE CULTIVOS DE CEPAS DE LEVADURAS Y DE BAL EN CASEÍNA Y EN EL SUSTRATO COMERCIAL (HIDROLIZADO CASEÍNICO) NZ-CASE PLUS**

---

### **Soluciones de caseína**

Las soluciones de caseína (Merck) se prepararon al 0,5 y 1 % (p/v), utilizando agua destilada a pH 8.0, a una temperatura de 40 °C para favorecer su disolución. Posteriormente, cada solución de caseína se llevó a pH 7,0 utilizando HCl 6 mol l<sup>-1</sup>. A las soluciones destinadas a efectuar ensayos con cultivos de levadura se les agregó lactosa al 3 % (p/v) y a las destinadas a ensayos con cultivos de BAL se les agregó sacarosa al 3 % (p/v). Todas las soluciones se esterilizaron por filtración, usando filtros de acetato de celulosa de 0,45 µm de diámetro de poros (Millipore).

### **Soluciones del sustrato comercial NZ-Case Plus**

Las soluciones del sustrato comercial NZ-Case Plus (Sigma) se prepararon al 0,5 y 1 % (p/v) en agua destilada, y se ajustaron a pH 7,0 utilizando HCl 6 mol l<sup>-1</sup>. Para realizar ensayos con cultivos de levadura, a cada solución se le agregó lactosa al 3 % (p/v), y para los ensayos con cultivos de BAL se les agregó sacarosa al 3 % (p/v). Todas las soluciones se esterilizaron por filtración usando filtros de acetato de celulosa de 0,45 µm de diámetro de poros (Millipore).

### **Cultivos de levaduras en caseína y en el sustrato comercial NZ-Case Plus**

A partir de los conservados, se activaron en caldo YM cada una de las cepas de levaduras, incubándolas durante 48 horas a 30 °C. Posteriormente se prepararon los cultivos iniciales incubando a una temperatura de 30 °C durante 48 horas las distintas cepas en las soluciones de caseína 0,5 y 1 % (p/v) y en las soluciones del sustrato comercial NZ-Case Plus al 0,5 y 1 %

(p/v), ambas con lactosa al 3 % (p/v). Un 1 % (v/v) de este cultivo inicial se añadió a 50 ml de cada solución y se propagó durante 48 horas a una temperatura de 30 °C. El proceso de propagación se detuvo mediante pasteurización a una temperatura de 112 °C durante 10 minutos.

Para este ensayo se utilizaron las siguientes cepas de levaduras: *Candida krusei* DBFIQ 1, *Candida famata* DBFIQ 24, *Bretanomyces custersii* DBFIQ 13, *Cryptococcus albidus* DBFIQ 8, *Candida incomunis* LTW1, *Dipodascus macrosporus* LTW4, *Candida blankii* LTW7, *Candida blankii* LTW9, *Candida inconspicua* LTW11, *Candida bertae* LTW14 y *Cryptococcus neoformans* LTW3.

### **Cultivos de bacterias ácido lácticas en caseína y en el sustrato comercial NZ-Case Plus**

A partir de los conservados, se activaron en Caldo Nutritivo (Merck) cada una de las cepas de BAL, incubándolas durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente se prepararon los cultivos iniciales incubando a una temperatura de 37 °C durante 24 horas las distintas cepas en las soluciones de caseína al 0,5 y 1 % (p/v) y en las soluciones del sustrato comercial NZ-Case Plus al 0,5 y 1 % (p/v), ambas con sacarosa al 3 % (p/v). Un 1 % (v/v) de este cultivo inicial se añadió a 50 ml de cada solución y se propagó durante 48 horas a una temperatura de 37 °C. El proceso de propagación se detuvo mediante pasteurización a una temperatura de 112 °C durante 10 minutos.

Para este ensayo se utilizaron las siguientes cepas de BAL: *Enterococcus faecalis* DBFIQ E24, *Enterococcus faecium* ETW4, *Lactobacillus dellbrueckii* subsp. *bulgaricus* DBFIQ LB92, *Lactobacillus helveticus* DBFIQ LH 303 y *Lactobacillus plantarum* DBFIQ LP31.

### **Procedimiento de obtención de los hidrolizados proteicos**

A partir de cada cultivo obtenido tanto con cada cepa de levadura como con cada cepa de BAL, se procedió a obtener los hidrolizados de proteína (HP) libres de células. Para ello, cada cultivo se centrifugó a 20000 x g por 10 minutos a 10 °C. El sobrenadante obtenido se filtró a través de papel Whatman N° 40. Se determinó el pH y, por último, cada sobrenadante de

cultivo se almacenó a -4 °C hasta su posterior utilización (Muguerza y col. 2006).

## **EXTRACTOS PEPTÍDICOS DE MANOPROTEÍNAS**

---

### **Extracción térmica de manoproteínas**

La extracción de manoproteínas se realizó de acuerdo al método de Peat y col. (1961) modificado por Cameron y col. (1988). A partir de cada conservado, las cepas de levaduras se activaron mediante 3 siembras sucesivas en caldo YM, incubando cada cultivo a 30 °C durante 48 horas. El cultivo final se obtuvo sembrando 4 ml del último pre-cultivo en 400 ml de caldo YM, e incubándolo a 30 °C durante 48 horas, en agitación. Luego del período de incubación, las células se centrifugaron a 3000 x g por 15 minutos y se lavaron 2 veces con agua MilliQ. A continuación, se re-suspendieron en una solución al 20 % (v/v) de buffer 0,1 mol l<sup>-1</sup> de citrato de potasio – 0,02 mol l<sup>-1</sup> de metabisulfito de potasio. El pH de la suspensión se ajustó a 7,0 con HCl 6 mol l<sup>-1</sup> y la mezcla se sometió a tratamiento térmico en autoclave, por 2 horas a 121 °C. Posteriormente, la suspensión resultante se centrifugó a 5000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se mezcló con 3 volúmenes de etanol 95 % (v/v) conteniendo 1 % (v/v) de ácido acético y se dejó toda la noche a 4 °C. El precipitado se colectó por centrifugación a 10000 x g por 10 minutos. Los extractos obtenidos se conservaron por liofilización y se almacenaron a -4 °C hasta su utilización.

### **Purificación de las manoproteínas por cromatografía de afinidad**

La purificación de cada extracto se llevó a cabo por cromatografía de afinidad utilizando Concanavalina A (Con A)-Sefarosa 4B (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Con A es una metaloproteína tetramérica aislada de *Canavalia ensiformis* (Jack bean). Con A une moléculas que contienen  $\alpha$ -D-manopiranosido,  $\alpha$ -D-glupiranosido y residuos estéricamente relacionados. La unión del azúcar requiere de grupos hidroxilos en los carbonos C-3, C-4 y C-5 para reaccionar con Con A. Con A acoplada a Sefarosa es rutinariamente usada para la separación y purificación de glicoproteínas, polisacáridos y

lipopéptidos. Para mantener las características de unión de Con A-Sefarosa 4B, la presencia de iones  $Mn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  es esencial. Éstos están presentes en exceso en el medio suministrado, pero el complejo ión metal-proteína permanece activo y es estable a pH neutro, aún en ausencia de iones metales libre.

*Procedimiento:*

La columna se cargó en total con 10 ml de gel, conteniendo aproximadamente 13 mg de Con A inmovilizada por mililitro de gel. Se lavó con 5 volúmenes de lecho de buffer de equilibrio (0,01 mol l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7,5, conteniendo 0,5 mol l<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> y 1 mmol l<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>), con un flujo de 2,5 ml min<sup>-1</sup>. Posteriormente, cada extracto de manoproteína disuelto en buffer de equilibrio se aplicó con un flujo de 1,0 ml min<sup>-1</sup>. A continuación, la columna se lavó con buffer de equilibrio hasta que la absorbancia a 280 nm fue de 0,05. Las manoproteínas se eluyeron con 0,1 mol l<sup>-1</sup> de metil  $\alpha$ -D-manopiranosido en buffer de equilibrio, con un flujo de 1,0 ml min<sup>-1</sup>, y se detectaron midiendo la absorbancia a 280 nm. Subsecuentemente, la columna se regeneró para su re-utilización con 10 volúmenes de lecho con buffer Tris-HCl 20 mmol l<sup>-1</sup> con 0,5 mol l<sup>-1</sup> NaCl, pH 8,5, seguido por re-equilibrio con buffer de equilibrio con un flujo de 2,5 ml min<sup>-1</sup>.

En dicha cromatografía se utilizaron una columna de vidrio (Largo: 180 mm; Diámetro: 13 mm), una bomba peristáltica Econo Gradient Pump y un colector de fracciones modelo 2110. Todos estos equipamientos fueron provistos por la empresa Bio-Rad. La absorbancia se midió con un espectrofotómetro marca Metrolab, modelo 1700.

**Diálisis**

La diálisis de cada extracto de manoproteína obtenido se realizó con el fin de eliminar las sales y restos de metil  $\alpha$ -D-manopiranosido, y poder estimar más aproximadamente el peso molecular (PM) de la muestra.

El proceso de diálisis consiste en un intercambio molecular a través de una membrana semipermeable con un tamaño de poro inferior al tamaño de la proteína. De esta forma, si se introduce en una disolución con el tampón final

deseado o H<sub>2</sub>O desionizada una membrana de diálisis rellena de la disolución de proteína, el tampón/H<sub>2</sub>O desionizada y las sales/azúcares se intercambiarán entre el interior y el exterior de la membrana, mientras que la proteína permanecerá en el interior, siempre que el PM de la misma sea mayor que el cut off de la membrana utilizada.

*Procedimiento:*

Las muestras de manoproteínas obtenidas se sometieron a diálisis a través de una membrana con un límite de exclusión de 1000 Da (Sigma), durante 24 horas a 4 °C y en agitación, frente a agua MilliQ (un volumen 1000 veces mayor al de la disolución de proteína). Durante ese tiempo se realizó un segundo cambio de la disolución externa. Luego las fracciones retenidas fueron liofilizadas y almacenadas a -4 °C.

***Digestión enzimática de manoproteínas***

***Enzimas utilizadas:***

*Tripsina:* es una endoproteasa de origen pancreático. Tripsina (E.C.: 3.4.21.4) es secretada por el páncreas y participa de la digestión de proteínas alimentarias y de otros procesos biológicos. Es una proteína globular de tamaño medio y es producida como una pro-enzima inactiva, tripsinógeno (Chen y col., 2009). Tripsina es una serino-proteasa, con especificidad de sustrato sobre la base de las cadenas laterales cargadas positivamente de los aminoácidos lisina y arginina (Brown y Wold, 1973). Cliva péptidos en el extremo C-terminal de dichos aminoácidos, excepto cuando el residuo siguiente es una prolina. Además, si un residuo ácido está a ambos lados del sitio de clivaje, la velocidad de hidrólisis ha demostrado ser más lenta. El peso molecular de tripsina es de 23,3 kDa y tiene un pH óptimo entre 7,5 y 8,5 (Koutsopoulos y col., 2007) y una temperatura óptima de 37 °C (Havlis y col., 2003).

*Proteinasa K:* es una endoproteasa de amplio espectro de acción, aislada a partir de extractos del hongo *Tritirachium album limber*. Proteinasa K (E.C.: 3.4.21.64) es una serino-endopeptidasa, la cual posee una amplia

especificidad de sustrato, clivando sobre el extremo C-terminal de aminoácidos alifáticos, hidrofóbicos y aromáticos, y especialmente de alanina (Ebeling y col., 1974). El peso molecular de proteinasa K es de 28,9 kDa y tiene un pH óptimo entre 7,5 y 12,0 y una temperatura óptima entre 20 y 60 °C (Sweeney y Walker, 1993a).

*Pepsina*: es la principal enzima proteolítica presente en el jugo gástrico de vertebrados. Su forma de precursor inactivo, pepsinógeno, se produce en las mucosas del estómago, y luego se hidroliza por efecto del pH ácido y adquiere su capacidad enzimática. Pepsina (E.C.: 3.4.23.1) tiene especificidad con preferencia hacia péptidos que contienen aminoácidos aromáticos o carboxílicos. Preferentemente cliva en el extremo C-terminal de fenilalanina y leucina y en menor medida sobre ácido glutámico. No cliva sobre valina, alanina o glicina (Sweeney y Walker, 1993b). El peso molecular de pepsina es de 34,5 kDa y posee un pH óptimo entre 2,0 y 4,0 (Fruton, 1971) y una temperatura óptima de 37 °C (Sweeney y Walker, 1993b).

*Quimotripsina*: es una serino-endopeptidasa producida por las células acinares del páncreas. Quimotripsina (E.C.: 3.4.21.1) se activa luego de la proteólisis de quimotripsinógeno por tripsina, y cliva selectivamente en el extremo C-terminal de residuos hidrofóbicos, tales como tirosina, fenilalanina, triptófano y leucina (Sweeney y Walker, 1993b). Sin embargo, se han informado algunos clivajes significantes en el extremo C-terminal de metionina, isoleucina, serina, treonina, valina, histidina, glicina y alanina. Además, la naturaleza del residuo vecino puede afectar la velocidad de clivaje de una unión particular. Independientemente de la naturaleza de x, la unión x-prolina no puede ser clivada (Baumann y col., 1970). Quimotripsina tiene un peso molecular de 25,6 kDa y posee un pH óptimo entre 7,5 y 8,5 (Wilcox, 1970) y su rango de temperatura varía entre 25 y 55 °C.

### *Procedimiento:*

En primer lugar se llevó a cabo la hidrólisis enzimática de cada uno de los extractos de manoproteínas con las enzimas tripsina, pepsina y proteinasa K, utilizadas en forma individual. Adicionalmente, cada uno de estos extractos



hidrolizados fue tratado con la enzima quimotripsina. La digestión con cada una de las enzimas se llevó a cabo a 37 °C durante 24 horas, excepto con proteinasa K, enzima con la cual se llevó a cabo por 18 horas. En todos los ensayos se utilizó una relación proteína-enzima de 50:1. Para la hidrólisis enzimática con tripsina, proteinasa K y quimotripsina se utilizó buffer Tris-HCl 30 mmol l<sup>-1</sup>, pH 8,0, y para la hidrólisis con pepsina se utilizó una solución de ácido acético al 5 % (v/v), pH 2.0. La hidrólisis enzimática se interrumpió, luego de transcurrido el tiempo determinado como óptimo para cada caso, por calentamiento a 100 °C durante 10 minutos. Todas las enzimas fueron provistas por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

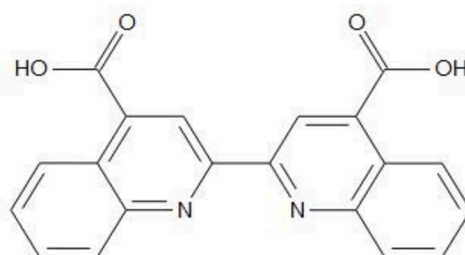
## CARACTERIZACIÓN PRIMARIA DE LOS HIDROLIZADOS DE MANOPROTEÍNAS Y DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS (HP) DE LEVADURAS Y DE BAL

---

### Determinación del contenido de proteínas: Método del ácido bicinconínico

La concentración de proteínas de cada uno de los extractos obtenidos se determinó por el método del ácido bicinconínico (ABC) (Fujimoto y col., 1985).

**Figura 6:** Estructura del ácido bicinconínico

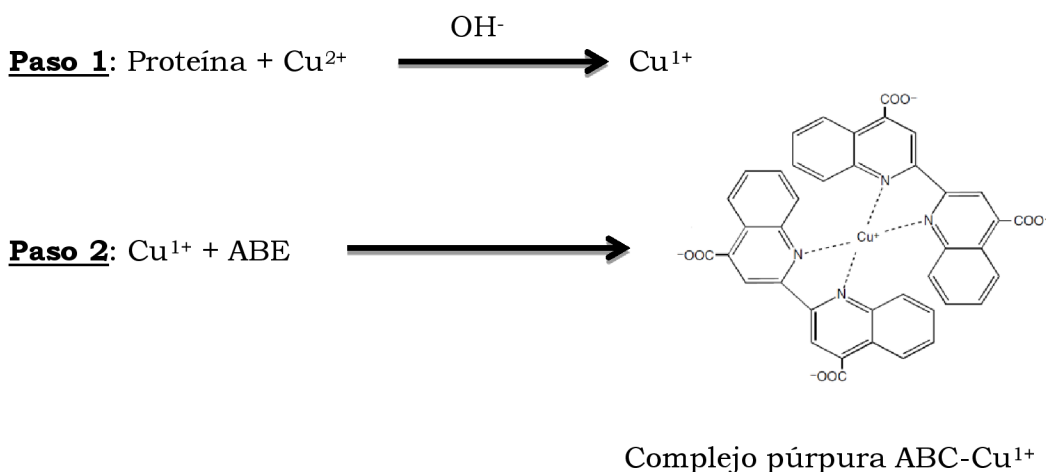


(Adaptado de Smith y col., 1985)

La técnica se basa en la reducción de Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup> por acción de las proteínas o péptidos, cuyos enlaces peptídicos se acomplejan con Cu<sup>2+</sup>, para luego oxidarse bajo condiciones alcalinas (reacción de Biuret). Posteriormente, el ión Cu<sup>+</sup> forma un quelato con dos moléculas de ABC, desarrollando un color púrpura intenso con un máximo de absorbancia a  $\lambda=562$  nm (Figura 7). Este

complejo soluble en agua presenta una absorbancia lineal en un rango comprendido entre 20 y 2000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Como el ABC es estable con estas condiciones alcalinas, el ensayo puede ser efectuado en un solo paso. La estructura macromolecular de la proteína, el número de enlaces peptídicos y la presencia de cuatro aminoácidos particulares (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) son los responsables de la formación del color con ABC. Otra ventaja de este ensayo es que el mismo es tolerante a componentes que suelen interferir con otros ensayos de determinación de proteínas, tal como el ensayo de Lowry. En particular, no resulta afectado por un conjunto de detergentes y agentes desnaturizantes tales como urea y cloruro de guanidinio. Además, como la generación de  $\text{Cu}^+$  es dependiente de la concentración de proteína y del tiempo de incubación, el contenido proteico de las muestras incógnitas debe determinarse espectrofotométricamente mediante la extrapolación en curvas realizadas con estándares de proteínas conocidas (Smith y col., 1985); Wiechelman y col., 1988). El patrón utilizado como proteína estándar en este trabajo para construir la curva de referencia fue Albúmina Bovina Estándar (ABE) (Sigma).

**Figura 7:** Fundamento del método del ácido bicinónico para la determinación del contenido de proteínas



En condiciones alcalinas, los iones  $\text{Cu}^{2+}$  reaccionan con la proteína, produciendo  $\text{Cu}^+$ . En la reacción subsecuente, el  $\text{Cu}^+$  reacciona con 2 moléculas de ABC, resultando un complejo con un intenso color púrpura, que se puede medir a 562 nm (adaptado de Smith y col., 1985).

*Procedimiento:*

Se mezclaron 100  $\mu$ l de muestra con 2 ml de Reactivo de Trabajo Estándar (RTE) (Tabla 2). Se homogeneizó la mezcla y se incubó a 60 °C durante 30 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego se midió el incremento de la absorbancia en espectrofotómetro Metrolab, modelo 1700, a una  $\lambda$ = 562 nm, utilizando como blanco de reactivo la solución RTE incubada en las mismas condiciones, aunque sin el agregado de muestra. El color es estable durante 1 hora (Walker, 2002).

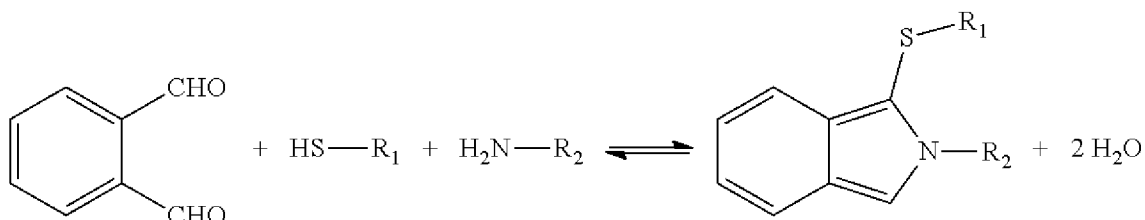
**Tabla 3:** Composición de los reactivos utilizados en el método del ABC

<b>Ensayo estándar</b>		
<b>Reactivo A</b>		
<i>Composición</i>	<i>Cantidad (g)</i>	<i>Observaciones</i>
ABC	0,10	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> anhidro	1,70	
NaOH	0,40	Se llevó a 100 ml con H <sub>2</sub> O MilliQ. El pH se ajustó a 11.25.
Tartrato de sodio dihidratado	0,16	
NaHCO <sub>3</sub>	0,95	
<b>Reactivo B</b>		
<i>Composición</i>	<i>Cantidad (g)</i>	<i>Observaciones</i>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,40	Se llevó a 10 ml con H <sub>2</sub> O MilliQ.
<b>Reactivo de Trabajo Estándar (RTE)</b>		
<i>Composición</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Observaciones</i>
Reactivo A	100 volúmenes (8 ml)	Solución color verde manzana y estable a temperatura ambiente durante 1 semana.
Reactivo B	2 volúmenes (160 $\mu$ l)	

## DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

El grado de hidrólisis se determinó mediante la reacción de los grupos amino libres con o-ftaldehído (OPA) en presencia de Ditiotreitól (DTT), formándose un compuesto coloreado que se detecta a 340 nm, siguiendo el procedimiento descrito por Nielsen y col. (2001). El número total de aminos libres se determinó sobre cada extracto obtenido, luego de haberlo sometido a hidrólisis enzimática.

**Figura 8:** Reacción de o-ftaldehído con una amina primaria en presencia de un tiol



Reacción de OPA con una amina primaria en presencia de ditiotreitól para producir 2-tioalquil-1-N-alkil-isoindol sustituido fluorescente, el cual se puede medir a 340 nm (adaptado de Nielsen y col., 2001).

### **Preparación del reactivo de color**

En 75 ml de H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> se disolvieron 0,9525 g de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O y 25 mg de dodecil sulfato de sodio (SDS). Al mismo tiempo, se preparó una solución con 20 mg de OPA en 2 ml de etanol. Posteriormente se mezclaron las soluciones anteriores y a continuación se agregaron 22 mg de DTT, se agitó suavemente para su correcta disolución y se enrasó en matraz aforado de 100 ml con H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>. Los extractos hidrolizados de manoproteínas se prepararon a una concentración de 1 mg ml<sup>-1</sup>, utilizando para los ensayos diluciones 1/10 y 1/20 de los mismos.

**Preparación de la curva estándar**

El reactivo estándar se preparó disolviendo 11 mg de L-serina en 10 ml de H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> Se construyó la curva de calibrado (Tabla 4) utilizando una dilución 1/10 de la solución anterior.

**Tabla 4:** Curva de calibrado para grupos aminos libres

	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> (μl)	Testigo (μl solución L-serina)
<b>Blanco</b>	30	0
<b>T1</b>	25	5
<b>T2</b>	20	10
<b>T3</b>	10	20
<b>T4</b>	5	25
<b>T5</b>	0	30

*Procedimiento:*

En una microplaca de poliestireno de 96 pocillos con fondo en U, se cargaron 30 μl de los correspondientes volúmenes del blanco, de la curva de calibrado y de las diluciones apropiadas de cada extracto hidrolizado. Posteriormente se agregaron 200 μl del reactivo de color. Se mezcló correctamente y se leyó a 340 nm luego de 10 minutos utilizando un lector de placas Asys UVM340 espectrofotométrico. Los aminos libres se calcularon a partir de la curva de calibrado, expresada como: Absorbancia *vs.* mEq de L-serina.

Todos los extractos hidrolizados de manoproteínas se prepararon a una concentración de 1 mg ml<sup>-1</sup>, utilizándose diluciones 1/10 y 1/20 de los mismos.

Todos los extractos hidrolizados de caseína y del sustrato comercial NZ-Case Plus se prepararon a una concentración del 1 % (p/v), utilizándose diluciones 1/10 y 1/20 y 1/100 de los mismos.

***Determinación de mEq totales***

Se pesaron 5 mg de cada muestra sin hidrolizar. Se agregaron 4 ml de HCl 6 mEq l<sup>-1</sup> y se dejó reposar 20 horas a 105 °C. Luego se evaporó el HCl en rotavapor y se recolectó la muestra en 5 ml de SDS al 1 % (p/v) (concentración final de la muestra: 1 mg ml<sup>-1</sup>). Posteriormente las muestras fueron diluidas en 1/10 para la determinación de los mEq totales por OPA, como fue descripto anteriormente.

**ANÁLISIS POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO DE SODIO**

---

Esta técnica, descripta por Schägger y von Jagow (1987), permite separar mezclas complejas de proteínas y polipéptidos en función de su tamaño molecular. El SDS es un detergente aniónico que se acompleja por absorción inespecífica a las proteínas y péptidos (aproximadamente una molécula de SDS cada dos aminoácidos, con una relación máxima de 1,41 g de SDS/g de proteína) y las desnatura completamente, rompiendo las interacciones no covalentes que determinan las estructuras terciarias y cuaternarias. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie, y todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (que excede la carga intrínseca de las cadenas de aminoácidos). Las proteínas reaccionan con SDS a relativamente alta concentración, pero se ha demostrado que 0,4 % (p/v) de SDS es el nivel mínimo necesario para saturar los sitios de unión de la proteína; sin embargo, se emplea 1 % (p/v) para lograr un margen de seguridad. La utilización de agentes reductores, como el β-mercaptoetanol, desnaturalizan las proteínas rompiendo los enlaces disulfuro y separándolas en las subunidades proteicas que las constituyen. Por último, la aplicación de calor permite la formación de enlaces estables SDS-proteína/péptido y, además, proporciona a las cadenas polipeptídicas una densidad de carga similar. De esta forma, cuando el complejo SDS-polipéptido se somete a electroforesis en un gel que contiene SDS, su velocidad de migración estará determinada principalmente por la masa de la partícula SDS-polipéptido, según el principio de exclusión molecular. El campo eléctrico sólo suministra la fuerza impulsora.

Se trabajó con el sistema discontinuo o de Laemmli (1970). El mismo consta de dos tipos de geles: un gel llamado concentrador, con un tamaño de poro no restrictivo (grande), que se forma sobre un segundo gel, llamado separador. En este sistema cada uno de los geles se prepara con tampones de diferente pH y fuerza iónica, y el tampón de electroforesis constituye un tercer tipo. La movilidad de una proteína en el gel concentrador es intermedia entre la movilidad de los iones cloruro  $\text{Cl}^-$  del gel y la movilidad del ión glicina  $\text{Gly}^-$  del tampón de muestra. Por tanto, entre ambos frentes existe una zona de baja conductividad y gran diferencia de voltaje, de forma que las proteínas se concentran en una zona muy reducida entre ambos iones. Una vez en el gel separador, el pH básico favorece la ionización de la glicina de forma que sus iones migran a través de los polipéptidos concentrados, justo por detrás de los iones cloruro. A partir de este momento las proteínas migran a través del gel separador en una zona de voltaje y pH uniforme, de forma tal que se separan en base a su tamaño. La capacidad de este sistema para concentrar la muestra mejora considerablemente la resolución de los geles.

La concentración de acrilamida, indicada como % T, representa el porcentaje en peso del monómero total empleado (acrilamida + entrecruzador bis-acrilamida en gramos por 100 ml), y determina la longitud promedio de la cadena del polímero. A mayor % T disminuye el tamaño del poro.

La concentración de bis-acrilamida, indicada como % C, representa el porcentaje de este monómero en el gel y determina el grado de entrecruzamiento.

El persulfato de amonio (APS) es el agente oxidante y la N,N,N,N'-tetrametilen-diamina (TEMED) es el agente reductor.

### ***Preparación de las muestras y siembra en los geles ya armados***

Se mezclaron, en relación 1:1 (v/v), el buffer de muestra y la muestra propiamente dicha. Se colocaron las muestras en Baño de María a ebullición (100 °C) durante 5 minutos y luego se las dejó enfriar a temperatura ambiente. Al trabajar en condiciones reductoras, se agregó al buffer de muestra 50  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -Mercaptoetanol por cada 950  $\mu\text{l}$  de buffer antes de hervir. Se utilizó una concentración de 1  $\text{mg ml}^{-1}$  de cada uno de los extractos hidrolizados de

manoproteínas y una concentración de 1 % de cada uno de los HP de caseína y del sustrato comercial NZ-Case Plus.

El volumen de sembrado dependerá de la cantidad de proteína de cada muestra, del volumen máximo que puede colocarse en cada pocillo, del método de tinción seleccionado y de la utilidad final que se le dará al gel. Teniendo en cuenta estos factores, durante el sembrado de los geles se depositaron 10 µl de muestra en cada pocillo para la determinación del patrón proteico de las diferentes muestras.

Como marcadores de peso molecular se utilizó un Kit de proteínas patrón (LowRange, Molecular Weight 6,5-66 kDa, Sigma) compuesto por las siguientes proteínas estándares:

Albúmina sérica bovina: 66 kDa; Ovoalbúmina obtenida de huevo de gallina: 45 kDa; Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa obtenida de músculo de conejo: 36 kDa; Anidrasa carbónica obtenida de eritrocitos bovinos: 29 kDa; Tripsinógeno obtenido de páncreas bovino: 24 kDa; Inhibidor de Tripsina obtenido de soja: 20 kDa; α-Lactalbúmina obtenida de leche bovina: 14,2 kDa; Aprotinina de pulmón bovino: 6.5 kDa.

### ***Condiciones de las determinaciones electroforéticas***

El análisis en SDS-PAGE se realizó en geles discontinuos de poliacrilamida (Gel de apilamiento: 4 % T, 2,7 % C; Gel de separación: 16 % T, 2,7 % C) bajo condiciones reductoras, de acuerdo al método de Laemmli (1970). La electroforesis se llevó a cabo con un equipo "Bio-Rad" modelo Mini-PROTEAN 3 Cell, con una fuente de poder "BIO-Rad" Power Pac Basic Power Suply. La misma se desarrolló durante 150 minutos a temperatura ambiente, a voltaje variable y amperaje constante de 15 mA. Finalizada la electroforesis, el gel se extrajo de los vidrios de soporte.

Se agregaron las soluciones de los catalizadores de polimerización a la preparación desgasificada de la solución del monómero y se mezclaron suavemente para homogeneizar e iniciar la polimerización. Para el gel de resolución: 50 µl de APS al 10 % (p/v) y 5 µl de TEMED, y para el gel de apilamiento: 50 µl de APS al 10 % (p/v) y 10 µl de TEMED.



**Tabla 5:** Formulación de los geles

Porcentaje de gel (%)	H <sub>2</sub> O <sub>(d)</sub> (ml)	Solución madre acrilamida/ bisacrilamida (ml)	Buffer de gel (ml)*	Solución de SDS al 10 % (p/v) (ml)
4	6,1	1,3	2,5	0,1
5	5,7	1,7	2,5	0,1
6	5,4	2,0	2,5	0,1
7	5,1	2,3	2,5	0,1
8	4,7	2,7	2,5	0,1
9	4,4	3,0	2,5	0,1
10	4,1	3,3	2,5	0,1
11	3,7	3,7	2,5	0,1
12	3,4	4,0	2,5	0,1
13	3,1	4,3	2,5	0,1
14	2,7	4,7	2,5	0,1
15	2,4	5,0	2,5	0,1
16	2,1	5,3	2,5	0,1
17	1,7	5,7	2,5	0,1
18	1,4	6,0	2,5	0,1
19	1,1	6,3	2,5	0,1

\*Para el gel de apilamiento, el buffer a utilizar es TRIS-HCl 0,5 mol l<sup>-1</sup>, pH 6,8 y para el gel de separación el buffer es TRIS-HCl 1,5 mol l<sup>-1</sup>, pH 8,8. Estos datos están calculados para 10 ml de gel.

### Método de tinción con plata

La tinción argéntica de los geles se llevó a cabo utilizando el método propuesto por Blum y col. (1987). La misma se aplicó para los extractos manoproteínicos. El procedimiento empleado se detalla a continuación:

- 1- El gel extraído de los vidrios de soporte se lavó con H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>
- 2- Luego se fijó con glutaraldehído al 5 % (v/v) durante 1 hora.
- 3- A continuación se lavó nuevamente con H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>
- 4- Luego se fijó con solución fijadora compuesta por metanol 50 % (v/v), ácido acético glacial 12 % (v/v) y 75 µl de formaldehído 37 % (v/v), durante 1 hora.
- 5- Se realizaron 3 lavados con metanol 30 % (v/v), de una duración de 20 minutos cada uno.
- 6- Posteriormente, se sumergió en solución de pre-tratamiento (0,02 % (p/v) de tiosulfato de sodio pentahidratado) por un 1 minuto.
- 7- Se realizaron 3 lavados con H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, de 20 segundos cada uno.

- 8- El gel se sumergió en solución de plata, durante 20 minutos.
- 9- Se realizaron 2 lavados con  $H_2O_{dest}$ , de 20 segundos cada uno.
- 10- Luego se lo sumergió en la solución de desarrollo, hasta que comenzó a teñirse y no aparecieron más manchas.
- 11- A continuación se lo sumergió en solución de finalización compuesta por metanol/ácido acético (10:12) en 100 ml de agua destilada, durante 10 minutos, para detener la reacción.
- 12- Por último se lo sumergió en solución de metanol al 30 % (v/v), al menos 20 minutos.

### **Método de tinción empleando el colorante Coomassie Blue R-250**

Solución colorante:

Se preparó disolviendo 0,1 g de Azul Brillante de Coomassie R-250 en 100 ml de solución decolorante y filtrando con papel Whatman N° 1 para remover partículas insolubles. Se almacenó a temperatura ambiente.

Uso: colorear durante 60 minutos

Solución decolorante:

Consiste en una mezcla de metanol/ácido acético/ $H_2O$  en relación (40:10:50)

400 ml de MeOH	} 1000 ml
100 ml de ACOOH	
500 ml de $H_2O_{dest}$	

Uso: decolorar el tiempo necesario hasta lograr la aparición de las bandas visibles.

*Procedimiento:*

Teñir el gel sumergiendo en la solución colorante con agitación suave u ocasional durante 1 hora aproximadamente.

Luego, lavar el gel con agua para remover el exceso de colorante y luego desteñir con la solución decolorante, con varios cambios de solución hasta

disminuir lo suficientemente el background para ver las bandas. Un desteñido excesivo puede llevar a la pérdida de algunas de las bandas de peso molecular pequeño o a la disminución en la intensidad de las bandas.

Esta tinción se empleó para todos los HP obtenidos con caseína.

### **MEDIDA DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA**

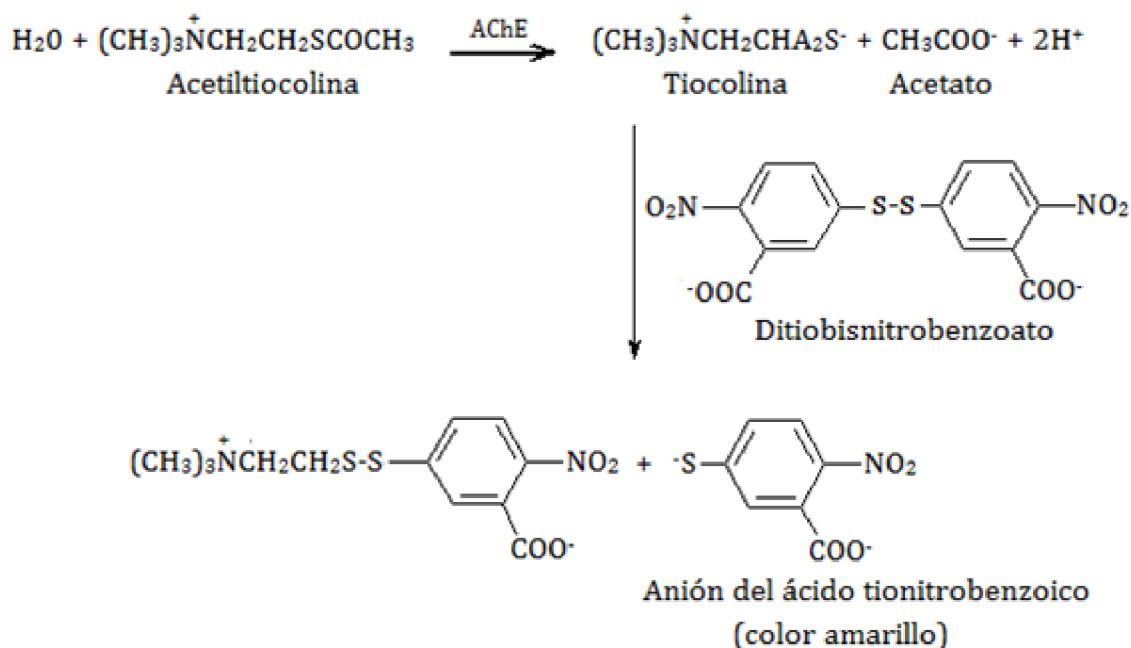
---

La determinación de la actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) se llevó a cabo empleando el método espectrofotométrico descrito por Ellman y col. (1961), el cual se fundamenta en dos reacciones acopladas (Figura 9):

1) Mediante la acción enzimática de AChE, la acetiltiocolina genera tiocolina y acetato.

2) La tiocolina y el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) generan un compuesto de coloración amarillenta, el anión del ácido tionitrobenzoico, cuya absorbancia se lee espectrofotométricamente a 405 nm.

**Figura 9:** Esquema de la reacción enzimática en que se basa el método colorimétrico para determinar la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa.



Representación realizada con ChemBioDraw 12.0 (CambridgeSoft).

### Métodos empleados:

**Método 1: Screening preliminar de todos los hidrolizados de manoproteínas.** Para ello, 100 µl de cada muestra se incubó con 7 µl de lisado de glóbulos rojos humanos\*, grupo "0" RH (+), fuente de la enzima acetilcolinesterasa, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 0,9 ml de DTNB (0,29 mmol l<sup>-1</sup>) y 33,3 µl de acetiltiocolina (156 mmol l<sup>-1</sup>) a cada dilución e inmediatamente se procedió a realizar la lectura espectrofotométrica a 405 nm, obteniéndose como medida cinética la velocidad inicial enzimática (ΔAbsorbancia/30 seg). Como control positivo de la inhibición se utilizó Galantamina 200 µmol l<sup>-1</sup>, y como control de la actividad basal de la enzima se utilizó buffer fosfato pH 7,7.

\*Se partió de sangre grupo "0" RH (+). Se centrifugó la sangre a fin de separar el suero del paquete globular. Se lavó 3 veces con solución fisiológica, centrifugando cada vez la suspensión y descartando los líquidos de lavado. Se tomaron 100 µl del paquete globular de la parte media del centrifugado, se los colocó en otro tubo y se le agregaron 2,4 ml de H<sub>2</sub>O MilliQ a fin de obtener una dilución 1/25. En estas condiciones se produjo la hemólisis de los glóbulos rojos.

**Cálculos:**

**Actividad Enzimática (U L<sup>-1</sup>): ( $\Delta$ Absorbancia/30seg)\*Factor**

**% Actividad Enzimática (%AE): (AEM/AEB)\*100**

**% Inhibición: 1 - %AE**

AEM: Actividad Enzimática de la Muestra; AEB: Actividad Enzimática Basal; Factor: 286764.

Factor:  $(10^6 \cdot \text{Vol. final del ensayo (l)} \cdot \text{factor de dilución}) / (\epsilon \cdot \text{paso óptico (cm)} \cdot \text{Vol. de muestra (l)})$ .  $\epsilon$ : coeficiente de extinción molar:  $13600 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

**Método 2: Determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI50) de los extractos más activos.** Se realizó un microensayo utilizando microplacas de 96 pocillos y se usó la enzima acetilcolinesterasa provista por Sigma. A 50  $\mu\text{l}$  de cada muestra se les agregaron 50  $\mu\text{l}$  de AChE ( $0,25 \text{ U ml}^{-1}$ ) y se dejó reposar la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de la solución sustrato conteniendo DTNB  $0,2 \text{ mmol l}^{-1}$ , yoduro de acetiltiocolina  $0,24 \text{ mmol l}^{-1}$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $0,04 \text{ mmol l}^{-1}$ , a pH 7,5. A continuación se procedió a realizar la lectura espectrofotométrica a 405 nm en detector ELISA, luego de 5 minutos. Como control positivo de la inhibición se utilizó Galantamina  $200 \mu\text{mol l}^{-1}$ , y como control de la actividad basal de la enzima se utilizó buffer fosfato salino pH 7.5 (Ortiz y col., 2012).

El porcentaje de inhibición producido por cada extracto se calculó de la siguiente manera:

$$\%I = 100 - \frac{E - B}{C - B} \times 100$$

E: lectura muestra; C: lectura control; B: lectura blanco.

La actividad inhibitoria es expresada como la concentración del hidrolizado de manoproteína necesaria para inhibir el 50 % de la actividad enzimática basal

(CI50). Las curvas actividad-concentración fueron generadas para la concentración de muestra (Abcisa) versus % de la actividad inhibitoria (ordenada). El rango de concentraciones ensayado de los extractos de manoproteína fue de 0,5 a 80 mg ml<sup>-1</sup>. Los valores de CI50 fueron obtenidos por los parámetros de la función ajustada usando el programa Origin 8.

$$Y = \min + (\max - \min) / (1 + 10^{(\log \text{ CI50} - x) * \text{hillslope}})$$

En esta ecuación, Y representa la actividad inhibitoria de AChE (%) y X el logaritmo de la concentración del inhibidor (mg ml<sup>-1</sup>). El parámetro min es igual a la línea de base del 100 % de inhibición y max el plato del 100 % de actividad. El parámetro CI50 da el centro de la transición. El hill Slope determina la pendiente de la curva en el centro de transición (Vermeirssen y col., 2002).

## **MEDIDA DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA**

---

La actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se determinó en cada extracto hidrolizado, empleando el método espectrofotométrico descrito por Hayakari y col. (1978) con algunas modificaciones. El mismo se fundamenta en la reacción colorimétrica específica entre el ácido hipúrico liberado por ECA y la 2,4,6-tricloro 1,3,5-triazina (TT), que genera un compuesto coloreado, cuya absorbancia se lee espectrofotométricamente a 382 nm.

### ***Método:***

#### ***Extracción de ECA:***

La enzima se extrajo a partir de pulmón de conejo. Para ello se homogeneizó en frío (utilizando un baño de hielo molido) 1 g de pulmón con buffer fosfato NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (JT Baker) 0,1 mol l<sup>-1</sup> pH 8,3 - sacarosa (Cicarelli) 0,25 mol l<sup>-1</sup> en relación 1:5, mezcla a la que se le agregaron 5 µl de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma) 0,1 mol l<sup>-1</sup> (PMSF es un inhibidor de serina-

proteasas usado comúnmente en la preparación de lisados celulares, en los que preserva a las proteínas celulares de su digestión por proteasas). Posteriormente, se centrifugó a 10000 x g durante 5 minutos a 4 °C.

### ***Ensayo de inhibición de la ECA:***

**Tabla 6:** Composición de los reactivos utilizados en el ensayo de inhibición de la ECA

	Blanco: Muestra + Enzima (BME)	Muestra + Enzima + Sustrato (MES)	Blanco: Enzima + Sustrato (BES)	Enzima + Sustrato (ES)
NaCl 5 mol l <sup>-1</sup> * (μl)	15	15	15	15
HHL (μl)	-	20	20	20
TF1 (μl)	195	175	195	195
Muestra** (μl)	20	20	-	-
Enzima (μl)	20	20	-	20
Incubación a 37 °C por 45 minutos.				
Enzima (μl)	-	-	20	-
TT (μl)	665	665	665	665
TF1(μl)	1100	1100	1100	1100

\*Punto Crítico: los 15 μl de NaCl deben colocarse bien en el fondo del tubo eppendorf, pues de lo contrario la actividad de la enzima se ve afectada. \*\*Se utilizó una concentración de 5; 2,5 y 1,25 mg ml<sup>-1</sup> de cada uno de los extractos hidrolizados de manoproteínas. Se utilizó una concentración de 0,5 y 1 % de cada uno de los hidrolizados proteicos de caseína y del sustrato NZ-Case Plus.

HHL: Solución de N-Hipuril-Histidil-Leucina (Sigma) de 10 mg en 3 ml de TF1; TF1: Tampón fosfato 0,1 mol l<sup>-1</sup>, pH: 8,3; TT: 2,4,6-tricloro 1,3,5-triazina.

En la Tabla 6 pueden observarse las cantidades de cada uno de los reactivos a utilizar para el ensayo. Cada mezcla fue incubada a 37 °C durante 45 minutos y la reacción fue detenida por la adición de 665 µl de TT en dioxano (30 mg ml<sup>-1</sup>) y 1,1 ml de tampón fosfato NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 mol l<sup>-1</sup> pH 8,3 (TF1). Se esperó durante 5 minutos para dar tiempo a la formación de color y posteriormente se centrifugó a 10000 x g por 10 minutos. A continuación se procedió a leer a 382 nm.

El resultado se expresó como:

$$\text{Actividad de ECA: } ((A_{MES} - A_{BME}) / (A_{ES} - A_{BES})) * 100$$

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \text{Actividad ECA}$$

### **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

---

#### ***Ensayo de difusión en agar***

Se emplearon como blancos las siguientes cepas bacterianas: *Escherichia coli* DBFIQ Ec 9, *Bacillus cereus* DBFIQ B 28, *Staphylococcus aureus* DBFIQ S 21 y *Listeria monocytogenes* DTUNLu 328, todas pertenecientes a la colección de las Cátedras de Microbiología y Biotecnología (FIQ-UNL). Para la detección de actividad antimicrobiana se usó el ensayo de difusión en agar (Tagg y Mc Given, 1971), según el cual se agregaron 0,5 ml de un cultivo de 12-16 horas de cada cepa blanco ensayada a 20 ml de Agar Nutritivo (Difco) fundido y enfriado a 45 °C, vertiéndolos luego en una placa de Petri estéril. Después de que la placa de medio agarizado solidifica a temperatura ambiente, se realizaron pozos de 6 mm de diámetro en las placas y se colocaron 50 µl de solución acuosa de cada muestra en cada pozo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas y luego se midieron los diámetros correspondientes a los halos de inhibición generados.

Se utilizó una concentración de 1 mg ml<sup>-1</sup> de cada uno de los extractos hidrolizados de manoproteínas, y una concentración de 1 % de cada uno de los HP de caseína y del sustrato comercial NZ-Case Plus.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.



### ***Determinación del modo de acción***

Como confirmación de la actividad antagonística de los extractos manoproteínicos más activos, se determinó el efecto de los mismos sobre la evolución de poblaciones celulares proliferantes de las cepas sensibles (determinación de la cinética de crecimiento). Para ello se agregó 1 ml del extracto manoproteínico a una concentración de 10 mg ml<sup>-1</sup> a 9 ml de cultivos en fase logarítmica de *L. monocytogenes* DTUNLu 328 y de *B. cereus* DBFIQ B 28, desarrollados en Caldo Nutritivo (Merck), y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. A intervalos apropiados (horas: 0, 3, 6, 9, 12 y 24), se determinó el número de células viables presentes en cada cultivo mediante conteos microbiológicos en Agar Nutritivo (Merck) (Schillinger y Lücke, 1989).

Como control se realizó una experiencia idéntica con cada microorganismo blanco utilizado, pero sin añadir a los cultivos de los mismos el extracto manoproteínico correspondiente.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

## **CARACTERIZACIÓN FINAL DE LOS HIDROLIZADOS DE MANOPROTEÍNAS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS**

---

### ***Cromatografía en fase reversa***

La cromatografía líquida de fase reversa se basa en la separación de solutos en función de su distribución entre una fase móvil polar y una fase estacionaria constituida por gel de sílice químicamente modificada con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipo. Las columnas cromatográficas más ampliamente utilizadas para la separación de péptidos y proteínas son las de C2, C4, C8 y C18. La fase móvil es polar, compuesta principalmente por agua con adición de solventes orgánicos polares tales como: metanol, propanol, etanol y acetonitrilo, para promover el desplazamiento del soluto desde la fase estacionaria a la fase móvil (Harris y Angal, 1989).

Las moléculas del soluto se retienen en la matriz en virtud de las interacciones hidrofóbicas que establecen con el gel de sílice modificado. Aunque las interacciones hidrofóbicas son en general bastante débiles, son también a

menudo muy numerosas, y para eluir las moléculas es siempre necesario disminuir la polaridad del disolvente, para lo cual se va incrementando la concentración del solvente orgánico en la mezcla de elución.

En la separación de aminoácidos y péptidos mediante fase reversa el soporte más comúnmente empleado posee una cadena lineal de 18 carbonos y se identifica como  $C_{18} |SiO_2|-(CH_2)_{17}-CH_3$ . La matriz está formada por partículas de gel de sílice de 55-105  $\mu m$  y tamaño de poro de 125 Å, permaneciendo el soporte activo en un rango de pH entre 2,0 y 8,0.

### ***Cromatografía líquida en fase reversa utilizando cartuchos Sep-Pak C18 Plus en tándem***

#### *Procedimiento:*

Se realizó un primer fraccionamiento de los extractos de manoproteínas más activos frente a AChE por cromatografía líquida en fase reversa. Para ello, tres cartuchos cortos Sep-Pak C18 Plus (número del producto: WAT023501, Waters) se ensamblaron en tándem y fueron lavados, primero con metanol, y posteriormente con acetonitrilo (ACN) 75 % (v/v) conteniendo ácido trifluoroacético (TFA) 0.1 % (v/v). Por último, se equilibraron con ACN 2 % (v/v) conteniendo TFA 0,1 % (v/v). Cada extracto de manoproteína fue disuelto en ACN 2 % (v/v) conteniendo TFA 0,1 % (v/v) y se aplicaron 10 ml (2 veces) de cada uno de ellos en una concentración de 2 mg ml<sup>-1</sup>. El flujo utilizado fue de 1 ml min<sup>-1</sup>, el cual se mantuvo constante durante toda la experiencia. Se equilibró con ACN 2 % (v/v) conteniendo TFA 0,1 % (v/v) (10 volúmenes de columna) y se procedió a realizar la elución de los péptidos con diferentes concentraciones de ACN: 15, 30 y 75 % (v/v) conteniendo TFA 0,1 % (v/v). Se pasaron 5 volúmenes de columna de cada mezcla. Se midió la absorbancia a 220 nm empleando un espectrofotómetro marca Metrolab, modelo 1700. Los volúmenes de muestra recolectados se concentraron y se liofilizaron en un equipo de la marca Rifcor (modelo L-M10-A-E50-CRT), equipado con bomba de vacío Dosivac (modelo DVR 140).

Las cromatografías se efectuaron utilizando una bomba peristáltica Econo Gradient Pump, de Bio-Rad. Las fracciones se recolectaron utilizando un colector de fracciones de la marca Bio-Rad (modelo 2110).

### ***Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)***

Las fracciones obtenidas de los extractos de manoproteínas más activos frente a AChE se analizaron por HPLC en fase reversa. Se utilizó un equipo Water (USA) y una columna analítica Beckman de C18 (5  $\mu$ m, 4,6 mm x 260 mm). Se empleó un sistema de dos solventes: Solvente A: 0,1 % (v/v) de TFA en agua; Solvente B: 0,08 % (v/v) de TFA en ACN. Tiempo de corrida: 20 minutos. Gradiente 5-50 % ACN. Detección UV a 220 nm.

### ***Análisis por Espectrometría de Masas MALDI-TOF***

La Espectrometría de Masas es una técnica analítica que permite realizar determinaciones estructurales, identificaciones y análisis de trazas. En la actualidad esta técnica constituye una alternativa a la Degradación de Ellman para el secuenciamiento de polipéptidos, y a métodos clásicos usados para la identificación de modificaciones post-transduccionales. Además es posible estudiar interacciones no covalentes, por ejemplo la unión antígeno-anticuerpo, y determinar el peso molecular de péptidos y proteínas.

Existen diferentes métodos suaves para la volatilización/ionización de moléculas lábiles. Uno de estos métodos es la Desorción por láser asistida por matriz (MALDI). En la ionización MALDI los analitos cocristalizados con una matriz apropiada son convertidos a iones mediante la acción de un láser. Esta fuente de ionización suele acoplarse a un analizador de tiempo de vuelo (Time Of Flight, TOF), en el que los iones se separan en función de su relación masa-carga, luego de ser acelerados en un campo eléctrico.

MALDI-TOF es hoy en día un método estándar para el análisis de péptidos y proteínas en general. El método se caracteriza por su sencillez de manejo, su robustez y su capacidad de automatización, así como por su alta sensibilidad y su relativa tolerancia a sales y otras interferencias.

#### *Procedimiento:*

Las fracciones más activas frente a AChE obtenidas por cromatografía en fase reversa empleando cartuchos Sep-Pack C18 se analizaron por Espectrometría de Masas MALDI-TOF. El rango de masas investigado fue desde 0 a 6000 Da. Estos análisis fueron realizados en un equipo MALDI-TOF-TOF Ultraflex II

Bruker Daltonics, en el centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría MALDI-TOF (CEQUIBIEM), UBA, Buenos Aires, Argentina.

### **Análisis por Cromatografía de Alto Rendimiento de Intercambio Aniónico con Detección Amperométrica Pulsada**

La Cromatografía de Alto Rendimiento de Intercambio Aniónico con Detección Amperométrica Pulsada (HPAEC-PAD) es comúnmente empleada para determinar analitos aniónicos sin derivatización, con alta selectividad y sensibilidad en muestras de diversas matrices. Es la técnica más conocida para el análisis de carbohidratos, incluyendo mono-, di-, tri-, oligo- y polisacáridos, alcoholes de azúcares y amino azúcares. Este tipo de cromatografía está basada en el hecho de que los carbohidratos en un medio fuertemente alcalino se ionizan, lo que los hace susceptibles de separación en una columna de intercambio iónico. Las columnas HPAEC usadas para carbohidratos están cubiertas con una resina de intercambio iónico. Por ejemplo, la columna Dionex PA1 (Sunnyvale, CA), optimizada para la separación de mono-, di-, oligo-, y polisacáridos de bajo peso molecular, está compuesta de gotas no porosas, de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, cubiertas de un material de intercambio aniónico amino cuaternario. Los sistemas HPAEC usan normalmente hidróxido de sodio como eluyente para separar mono- y disacáridos, mientras que eluyentes con mayor fuerza iónica, como ser acetato de sodio, se emplea para moléculas de mayor tamaño. El detector de elección para HPAEC es el detector amperométrico pulsado (PAD). En general, la amperometría mide el cambio en la corriente que resulta de la oxidación o reducción de un compuesto en un electrodo. En PAD, esto es la medida del cambio en la corriente que resulta de la oxidación de carbohidratos en un electrodo de platino u oro. La ventaja de PAD no es sólo el bajo límite de detección, reportado en el orden de los picomoles, sino también su idoneidad para la elución por gradiente, la cual provee un análisis con mayor flexibilidad al optimizar las condiciones de separación.

*Procedimiento:*

### *Hidrólisis*

Las muestras se hidrolizaron con ácido trifluoroacético 2 mol l<sup>-1</sup> durante 2 horas a 100 °C. El ácido se eliminó por evaporación y el hidrolizado se llevó a sequedad y se re-suspendió en agua para ser analizado por HPAEC-PAD.

### *Análisis de azúcares por HPAEC-PAD*

El análisis de los azúcares se realizó en un sistema DX-500 Dionex BioLC (Dionex Corporation) equipado con un detector de pulso amperométrico (PAD) para la detección de azúcares que utiliza un electrodo de referencia de AgCl y un electrodo de trabajo de Au (Hardy y Townsend, 1994). Para el análisis de monosacáridos se utilizó una columna CarboPack P-20 equipada con una pre-columna P-20. El volumen de inyección para cada análisis fue de 20 µl. Se utilizó una elución isocrática con NaOH 16 mmol L<sup>-1</sup> y un flujo de 0,5 ml min<sup>-1</sup>.

Estos análisis se llevaron a cabo en el marco de colaboraciones científicas con las Dras. Alicia Couto y Malena Landoni del Centro de Investigaciones en Hidratos de Carbono (CIHIDECAR), CONICET-UBA, Buenos Aires, Argentina.

## **Cromatografía Líquida acoplada a Electrospray y Espectrometría de Masas en tándem**

Las fracciones peptídicas fueron se analizaron en un cromatógrafo líquido nanoAcquity (Waters) acoplado a Espectrómetro de Masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Las muestras se re-suspendieron en ácido fórmico (AF) al 1 % (v/v) e inyectadas para la separación cromatográfica. Los péptidos fueron atrapados en una columna Symmetry C18<sup>TM</sup> (5 µm x 180 µm x 20 mm; Waters) y se separaron usando una columna de C18 de fase reversa (75 µm Øi, 25 cm, nanoAcquity, 1,7 µm columna BEH; Waters). Para la elución de los péptidos se utilizó un gradiente de 2 a 40 % de B en 20 min, seguido por gradiente de 40 a 60 % en 5 min (A: 0,1 % AF en agua; B: 100 % ACN, 0,1 % AF), con un flujo de 250 nl min<sup>-1</sup>.

Los péptidos eluidos fueron sometidos a ionización electrospray en una aguja emisor (PicoTip™, New Objective) con un voltaje aplicado de 2000 voltios. Las masas peptídicas ( $m/z$  300 - 1700) se midieron en full Scan MS (en el Orbitrap con una resolución de 60000 FWHM a 400  $m/z$ ). Hasta 10 de los péptidos más abundantes (intensidad mínima de 500 cuentas) se seleccionaron en cada análisis MS para luego ser fragmentados en la trampa CID (Collision Induced Dissociation) con Helio como gas de colisión y con una energía de colisión normalizada del 38 %. Los tiempos de exploración fueron: Full MS: 250 ms y MSn: 120 ms. Los datos se adquirieron con el Software Thermo Xcalibur (v.2.2) en formato de raw data.

Thermo Proteome Discoverer (v.1.4.1.14) se usó para la búsqueda de la raw data obtenida en los análisis de MS contra las bases de datos tanto de Uniprot Saccharomycetales o Swiss Prot Saccharomyces con el motor de búsqueda SequestHT.

Tanto un objetivo como una base de dato señuelo se utilizaron para obtener una tasa de falsos positivos (FDR, false discovery rate). Para mejorar la sensibilidad de la búsqueda en base de datos, se utilizó Percolator (máquina de aprendizaje semi-supervisada) para discriminar los espectros peptídicos correctos de los incorrectos.

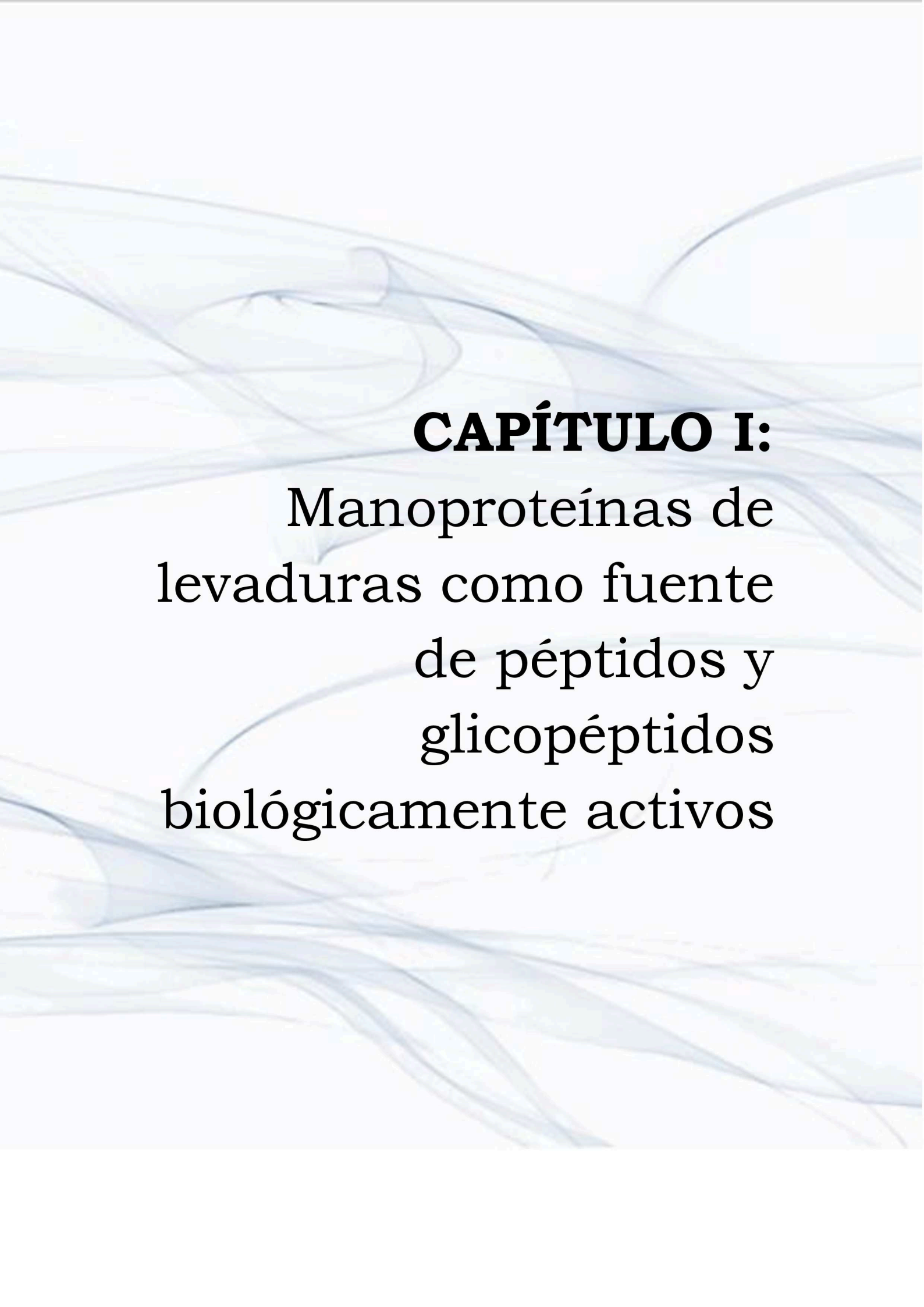
Para todas las búsquedas, se aplicaron los siguientes parámetros de búsqueda:

Modificaciones variables de oxidación (Metionina)

Tolerancia peptídica: 10 ppm y 0,6 Da (respectivamente para el espectro MS y el espectro MS/MS)

Blanco Percolator FDR (estricto): 0,01; validación basada en: q-value.

Los análisis de Espectrometría de masas y el secuenciamiento de novo de los péptidos presentes en las diferentes fracciones se realizaron en el marco de colaboraciones científicas con las Dras. Eliandre de Oliveira y Antonia Odena de la Plataforma de Proteómica, Parc Científic de Barcelona, España.



**CAPÍTULO I:**  
Manoproteínas de  
levaduras como fuente  
de péptidos y  
glicopéptidos  
biológicamente activos



**RESULTADOS**  
**Y**  
**DISCUSIÓN**



## EXTRACCIÓN TÉRMICA DE MANOPROTEÍNAS. PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD Y DIÁLISIS

---

Se emplearon 5 cepas de levaduras pertenecientes a los géneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Brettanomyces* y *Pichia*. La extracción de manoproteínas a partir de cada cepa de levadura se realizó por tratamiento térmico en autoclave a 121 °C por el término de 2 horas.

Las especies de levaduras empleadas fueron: *Candida blankii* LTW7, *Candida famata* DBFIQ L17, *Saccharomyces cerevisiae* DBFIQ L2, *Brettanomyces intermedius* DBFIQ L12 y *Pichia anomala* LTW6.

Dichas cepas forman parte de la colección propia de las Cátedras de Microbiología y Biotecnología, del Dto. de Ingeniería en Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) - UNL.

En la Tabla 7 se pueden ver los resultados obtenidos luego de cada etapa de extracción y posterior purificación por Concanavalina A - Sefarosa 4B de los extractos de manoproteínas. En la misma se detallan: el peso húmedo de las células, el peso húmedo y seco de cada extracto crudo obtenido luego del tratamiento térmico, la cantidad de proteína para cada uno de los extractos y el porcentaje de manoproteínas para cada cepa de levadura en estudio.

Los resultados expuestos muestran que el procedimiento de extracción térmica permitió aislar manoproteínas a partir de las paredes celulares de todas las cepas estudiadas. La cantidad de manoproteínas obtenida por cada 100 gramos de células (peso húmedo) fue similar en todos los casos, excepto para *C. blankii* LTW7, con la cual se obtuvo el mayor rendimiento (5,30 %).

Al comparar estos resultados con los publicados por Cameron y col. (1988), se observa que estos autores obtuvieron, en general, porcentajes más altos de manoproteínas que los obtenidos en este estudio, con valores de rendimientos comprendidos entre 2,9 % (para la cepa de *Torulopsis ernobii* NRCC 2663) y 18 % (para la cepa de *Pichia abadieae* NRCC 2644 y una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*).

**Tabla 7:** Rendimiento de las manoproteínas extraídas de las 5 cepas de levaduras en estudio

Cepas de levaduras	Peso Húmedo (células) (g)	Peso húmedo del extracto crudo (obtenido luego del tratamiento térmico) (g)	Peso seco del extracto crudo (liofilizado) (mg)	Cantidad de proteínas (mg de proteínas totales/g de crudo seco liofilizado)	% de manoproteína [g de manoproteína/100 g de células (peso húmedo)]
<i>P. anomala</i> LTW6	8,3	1,90	499,5	330	3,41
<i>C. blankii</i> LTW7	8,0	1,20	627,3	390	5,30
<i>C. famata</i> DBFIQ L17	7,8	1,62	494,8	410	3,52
<i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2	9,3	2,20	514,8	360	3,55
<i>B. intermedius</i> DBFIQ L12	2,8	0,58	218,5	245	3,45

En la actualidad se obtienen extractos de levaduras por procedimientos enzimáticos o térmicos, o por combinación de ambos métodos. El tipo de método usado puede tener una gran influencia en las características de la fracción manoproteica obtenida (Núñez y col., 2006). Sin embargo, en un estudio realizado por Cameron y col. (1988) se encontraron similares resultados en la composición de los extractos obtenidos por tratamiento enzimático (con la enzima zimoliasa) y por tratamiento térmico.

Por su parte Dupin y col. (2000) evaluaron diferentes métodos de extracción y observaron que el tratamiento más efectivo para la liberación de manoproteínas fue el realizado con la enzima zimoliasa.

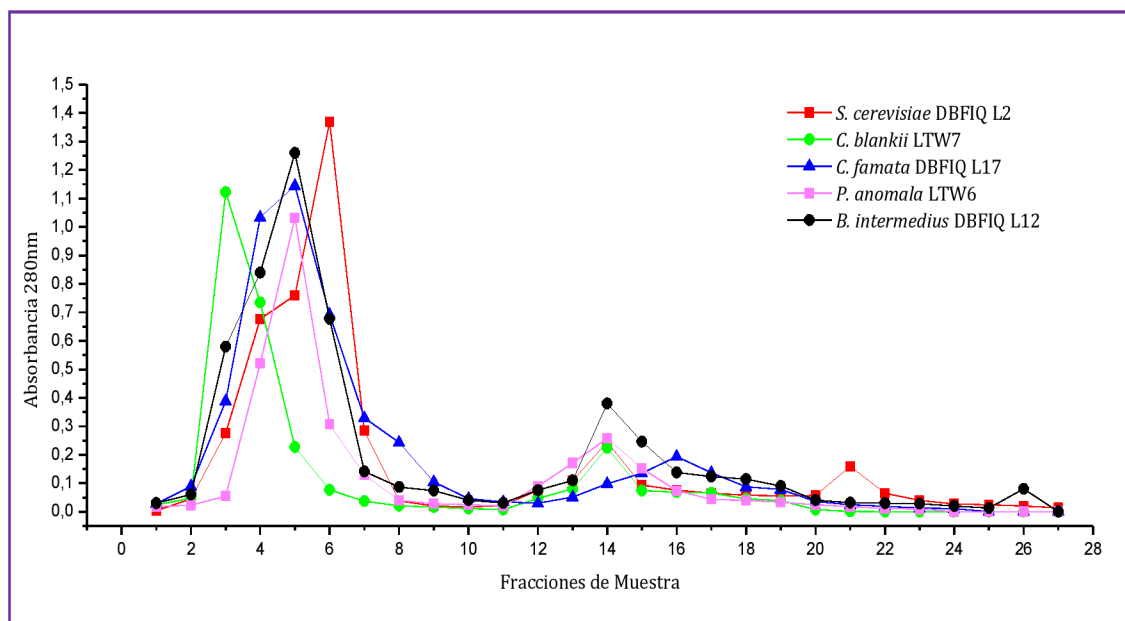
En estudios más recientes, donde se utilizaron ambos métodos de extracción (térmico y enzimático), se observaron diferencias en la composición de proteínas y de polisacáridos. Así, el extracto de manoproteína enzimático tuvo una mayor proporción de polisacáridos que el extracto de manoproteína

térmico, mientras que el contenido de proteínas fue más alto en el extracto térmico (aproximadamente 3 veces más). Manosa fue el principal azúcar presente en las glicoproteínas de ambos extractos, confirmando que a pesar del método utilizado, las manoproteínas fueron el principal componente de los extractos. Se observó también que la extracción térmica produjo fracciones proteínicas más heterogéneas que el procedimiento enzimático (Núñez y col., 2006; Gañan y col., 2009). Esto puede deberse a que los procedimientos de extracción térmica pueden facilitar la disrupción de las uniones no covalentes, mientras que la enzima zimoliasa sólo tiene la capacidad de clivar los glucanos en los puntos de anclaje con la pared celular (Dupin y col., 2000).

Las manoproteínas contenidas en los extractos crudos fueron aisladas por cromatografía de afinidad, utilizando la lectina Concanavalina A. Las lectinas son frecuentemente usadas para purificar glicoproteínas provenientes de extractos biológicos porque, en contraste con los procedimientos de purificación convencionales (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico o filtración por gel), que aprovechan las propiedades físicas generales de las glicoproteínas, las lectinas reconocen estructuras tridimensionales específicas creadas por un cluster de residuos de azúcar. Los procedimientos de purificación convencionales son generalmente ensayados antes de la aplicación de la cromatografía de afinidad con lectinas (Freeze, 2001). Con A inmovilizada ha sido usada en procedimientos de purificación por cromatografía de afinidad de diferentes manoproteínas de levaduras (Núñez y col., 2006; Gañan y col., 2009; Gonçalves y col., 2002; So y Goldstein, 1968 y Huang y col., 2002), debido a su especificidad por los residuos de  $\alpha$ -D-manosa y  $\alpha$ -D-glucosa y porque la unión de glicoproteínas solubles en el gel es fácilmente reversible por la adición de un carbohidrato de bajo peso molecular o de sus derivados (So y Goldstein, 1968).

En la Figura 10 se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos cuando se empleó Con A como matriz para la purificación inicial de cada uno de los extractos de manoproteínas.

**Figura 10:** Perfiles de elución por cromatografía de afinidad para cada extracto de manoproteínas.



Patrones cromatográficos de los extractos de manoproteínas utilizando Con A luego del tratamiento con metil  $\alpha$ -D-manopiranosido. Se observa que los picos de manoproteínas eluyen entre las fracciones 12 y 26.

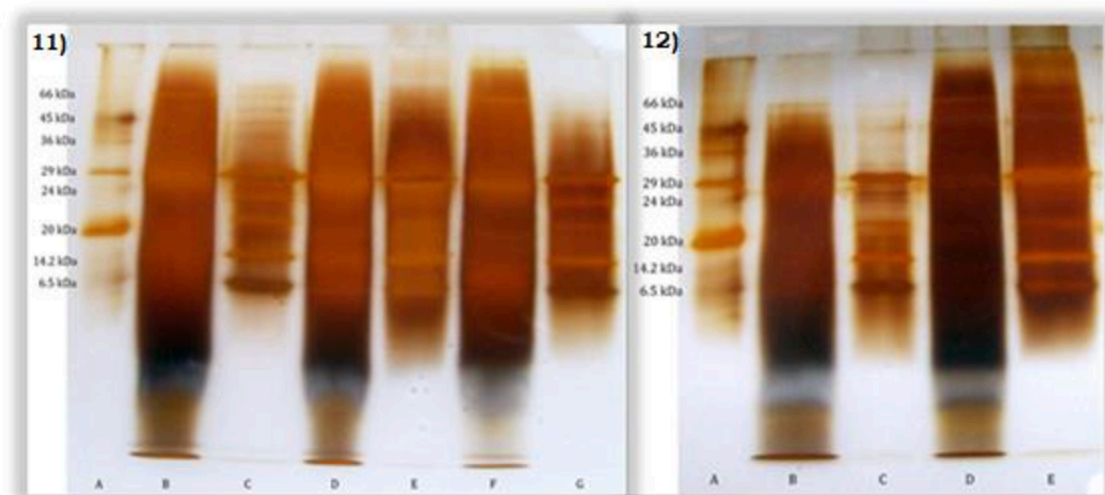
Puede observarse que los picos de manoproteínas aparecen en el intervalo de muestras comprendido entre las fracciones (tubos) 12 y 26, cuando fueron eluidos empleando el carbohidrato metil  $\alpha$ -D-manopiranosido. Los picos comprendidos entre las fracciones 0 y 10 corresponden al resto del extracto crudo sin retener en la columna de afinidad.

Los extractos de manoproteínas resultantes fueron dializados, liofilizados y almacenados a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización.

## ANÁLISIS POR SDS-PAGE

Las Figuras 11 Y 12 muestran que cuando los extractos crudos sin purificar fueron analizados por SDS-PAGE, se obtuvieron manchas difusas en cada calle correspondiente a cada uno de los mismos. En cambio, cuando las fracciones de manoproteínas obtenidas por cromatografía de afinidad utilizando Con A se sometieron al mismo análisis, se observaron bandas correspondientes a diferentes pesos moleculares (PM).

**Figuras 11 y 12:** Resultados de los análisis por SDS-PAGE (porcentaje del gel de separación: 16 %) de cada uno de los 5 extractos sin purificar y purificados



**Figura 11:** A: Patrones de PM; B: Extracto de manoproteínas de *P. anomala* LTW6 sin purificar; C: Extracto de manoproteínas de *P. anomala* LTW6 purificado por Con A; D: Extracto de manoproteínas de *C. blankii* LTW7 sin purificar; E: Extracto de manoproteínas de *C. blankii* LTW7 purificado por Con A; F: Extracto de manoproteínas de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 sin purificar; G: Extracto de manoproteínas de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 purificado por Con A.

**Figura 12:** A: Patrones de PM; B: Extracto de manoproteínas de *B. intermedius* DBFIQ L12 sin purificar; C: Extracto de manoproteínas de *B. intermedius* DBFIQ L12 purificado por Con A; D: Extracto de manoproteínas de *C. famata* DBFIQ L17 sin purificar; E: Extracto de manoproteínas de *C. famata* DBFIQ L17 purificado por Con A.

Estas bandas indican, en general, que la extracción térmica produce fracciones proteínicas heterogéneas, y que los PM de las manoproteínas

separadas por cromatografía de afinidad, provenientes de cada cepa de levadura estudiada, son similares en todos los casos. Dichos PM estuvieron comprendidos entre aproximadamente 6,5 y 30 kDa.

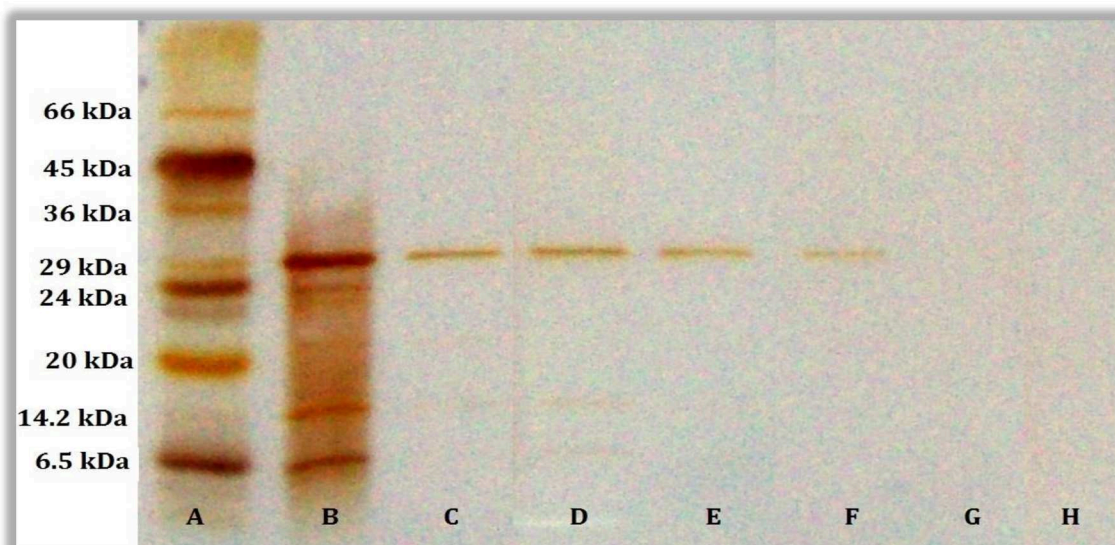
En un estudio realizado por Gañan y col. (2009) se detectaron bandas de similar PM en un extracto obtenido de una cepa de *Candida jejuni* por el proceso de extracción térmica de manoproteínas. Además, Núñez y col. (2006), luego de realizar la caracterización molecular por SDS-PAGE de un extracto de manoproteínas obtenido por tratamiento térmico, detectaron la presencia de 4 bandas con PM comprendidos entre 10 y 30 kDa, valores coincidentes con los obtenidos en el presente estudio.

Posteriormente, cada uno de los extractos de manoproteínas purificados por Con A - sefarosa 4B fueron tratados con las enzimas proteolíticas tripsina, pepsina y proteinasa K, tres serino-endopeptidasas con diferentes especificidad de sustrato, para obtener diferentes extractos hidrolizados de manoproteínas. En segundo lugar, cada uno de estos extractos hidrolizados de manoproteínas fue hidrolizado por segunda vez con la enzima quimotripsina, otra serino-endopeptidasa, para obtener extractos con un mayor grado de hidrólisis.

Los resultados de la hidrólisis con las enzimas proteolíticas sobre cada uno de los extractos de manoproteínas permitieron observar por SDS-PAGE disminución de las bandas proteicas. En las Figura 13 a 17 se pueden apreciar los resultados obtenidos al efectuar los tratamientos de hidrólisis enzimática.

Para el extracto obtenido de la cepa *S. cerevisiae* DBFIQ L2 (Figura 13) se comprobó una marcada reducción de las bandas de manoproteínas luego del tratamiento con tripsina, pepsina, proteinasa K y tripsina/quimotripsina, y una desaparición total de las mismas luego del tratamiento con pepsina/quimotripsina y proteinasa K/quimotripsina.

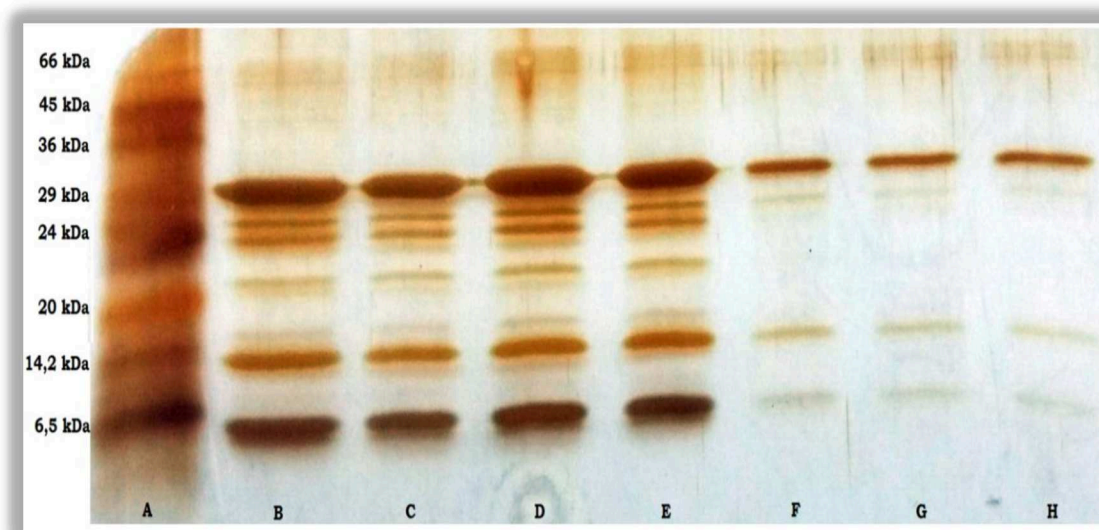
**Figura 13:** Resultados de SDS-PAGE (porcentaje de gel de separación: 16 %) para los hidrolizados con distintas proteasas de las manoproteínas de la cepa *S. cerevisiae* DBFIQ L2



**A:** Patrones de PM; **B:** Extracto de manoproteínas de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 purificado por Con A; **C:** Extracto hidrolizado con tripsina; **D:** Extracto hidrolizado con proteinasa K; **E:** Extracto hidrolizado con pepsina; **F:** Extracto hidrolizado con tripsina/quimotripsina; **G:** Extracto hidrolizado con pepsina/quimotripsina; **H:** Extracto hidrolizado con proteinasa K/quimotripsina.

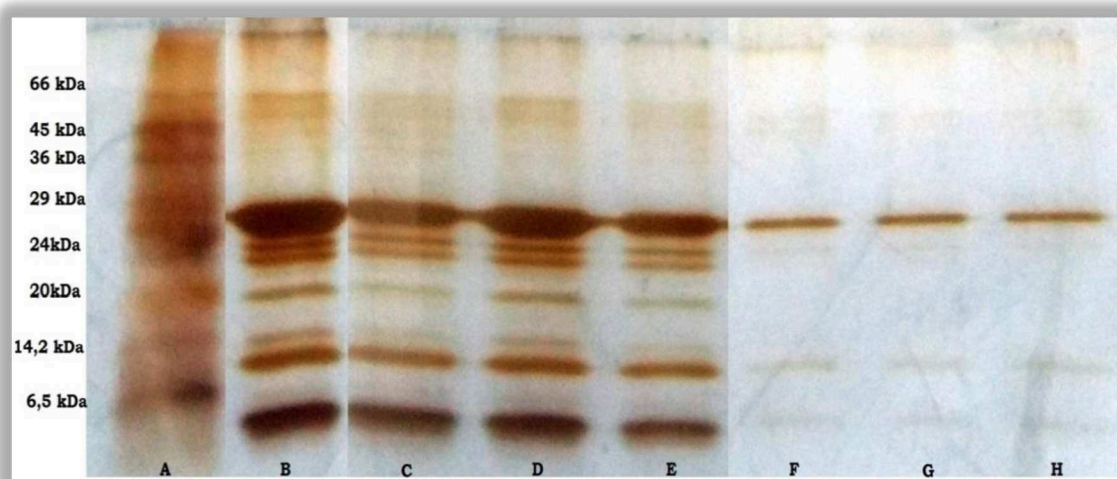
En lo que respecta a los hidrolizados del extracto de *C. famata* DBFIQ L17 (Figura 14) y del extracto de *B. intermedius* DBFIQ L12 (Figura 15) se puede observar una disminución considerable de la intensidad de las bandas de manoproteínas luego del tratamiento enzimático, con tripsina/quimotripsina, pepsina/quimotripsina y proteinasa K/ quimotripsina. En cambio, para los extractos hidrolizados con tripsina, pepsina y proteinasa K sólo se aprecia una ligera reducción de la intensidad de las diferentes bandas proteicas.

**Figura 14:** Resultados de SDS-PAGE (porcentaje de gel de separación: 16 %) para los hidrolizados con distintas proteasas de las manoproteínas de la cepa *C. famata* DBFIQ L17



**A:** Patrones de PM; **B:** Extracto de manoproteínas de *C. famata* DBFIQ L17 purificado por Con A; **C:** Extracto hidrolizado con tripsina; **D:** Extracto hidrolizado con pepsina; **E:** Extracto hidrolizado con proteinasa K; **F:** Extracto hidrolizado con tripsina/quimotripsina; **G:** Extracto hidrolizado con pepsina/quimotripsina; **H:** Extracto hidrolizado con proteinasa K/quimotripsina.

**Figura 15:** Resultados de SDS-PAGE (porcentaje de gel de separación: 16 %) para los hidrolizados con distintas proteasas de las manoproteínas de la cepa *B intermedius* DBFIQ L12

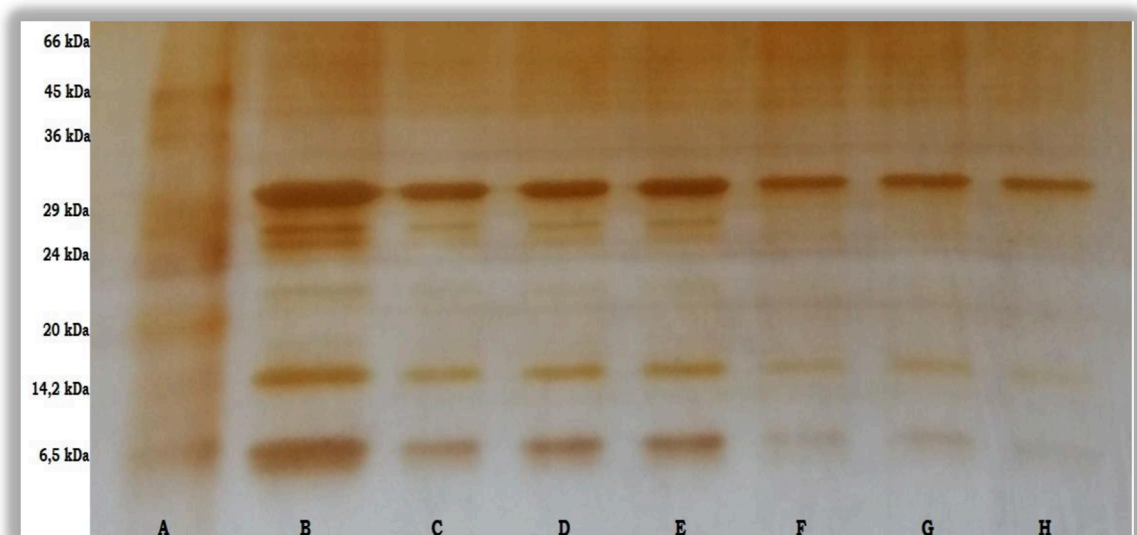


**A:** Patrones de PM; **B:** Extracto de manoproteínas de *B. intermedius* DBFIQ L12 purificado por Con A; **C:** Extracto hidrolizado con tripsina; **D:** Extracto hidrolizado con pepsina; **E:** Extracto hidrolizado con proteinasa K; **F:** Extracto hidrolizado con tripsina/quimotripsina; **G:** Extracto hidrolizado con pepsina/quimotripsina; **H:** Extracto hidrolizado con proteinasa K/quimotripsina.



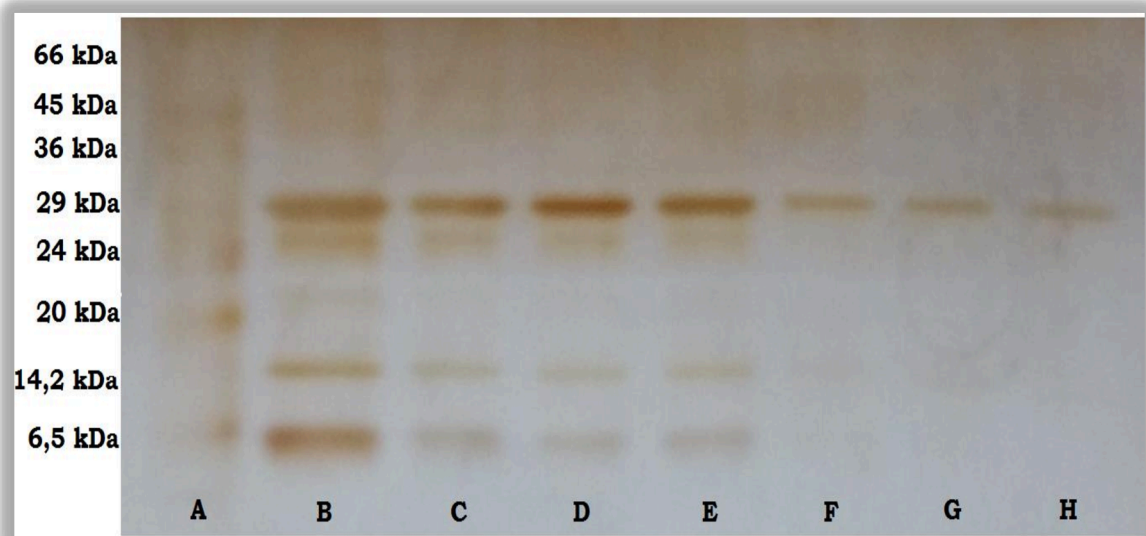
En las Figuras 16 y 17 se puede ver que los extractos hidrolizados de manoproteínas de *C. blankii* LTW7 y *P. anomala* LTW6 también presentaron similar comportamiento entre sí. Se observa que la hidrólisis con tripsina, pepsina y proteinasa K fue menos intensa, apreciándose una menor disminución de las bandas de manoproteínas en los geles de electroforesis. En lo que respecta a los extractos doblemente hidrolizados, se aprecia que la reducción de las bandas de manoproteínas fue considerable y, en algunos casos, dichas bandas resultaron casi imperceptibles.

**Figura 16:** Resultados de SDS-PAGE (porcentaje de gel de separación: 16 %) para los hidrolizados con distintas proteasas de las manoproteínas de la cepa *C. blankii* LTW7



**A:** Patrones de PM; **B:** Extracto de manoproteínas de *C. blankii* LTW7 purificado por Con A; **C:** Extracto hidrolizado con tripsina; **D:** Extracto hidrolizado con pepsina; **E:** Extracto hidrolizado con proteinasa K; **F:** Extracto hidrolizado con tripsina/quimotripsina; **G:** Extracto hidrolizado con pepsina/quimotripsina; **H:** Extracto hidrolizado con proteinasa K/quimotripsina.

**Figura 17:** Resultados de SDS-PAGE (porcentaje de gel de separación: 16 %) para los hidrolizados con distintas proteasas de las manoproteínas de la cepa *P. anomala* LTW6



**A:** Patrones de PM; **B:** Extracto de manoproteínas de *P. anomala* LTW6 purificado por Con A; **C:** Extracto hidrolizado con tripsina; **D:** Extracto hidrolizado con pepsina; **E:** Extracto hidrolizado con proteinasa K; **F:** Extracto hidrolizado con tripsina/quimotripsina; **G:** Extracto hidrolizado con pepsina/quimotripsina; **H:** Extracto hidrolizado con proteinasa K/quimotripsina.

Estos resultados observados permiten inferir indirectamente la potencial formación de una cierta cantidad y variedad de péptidos o glicopéptidos por hidrólisis enzimática de los distintos extractos de manoproteínas obtenidos de las diferentes cepas de levaduras.

### **DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS**

La modificación de la estructura de las proteínas alimentarias mediante hidrólisis enzimática permite mejorar las propiedades funcionales, nutricionales e inmunológicas del alimento original, sin perder valor nutritivo. Mediante hidrólisis enzimática se obtienen determinados péptidos con actividad biológica demostrada, que se emplean en la formulación de nuevos productos proteicos de alto valor agregado (alimentos funcionales). En la hidrólisis enzimática de proteínas hasta péptidos o aminoácidos, por acción de enzimas proteolíticas, la composición final y, por tanto, el uso de los hidrolizados, dependerá principalmente de la fuente proteica, del tipo de

proteasa usada, de las condiciones de hidrólisis y del grado de hidrólisis alcanzado en la reacción.

Es por ello que se evaluó la capacidad proteolítica de las enzimas tripsina, pepsina, proteinasa K y quimotripsina, a 37 °C y por un período de 24 horas sobre manoproteínas aisladas de distintas cepas de levaduras de origen alimentario. Para proteinasa K, el período de hidrólisis ensayado fue sólo de 18 horas. La extensión de la proteólisis fue cuantificada como grado de hidrólisis (GH), utilizando el método del o-ftalaldehído (OPA). El mismo está referido al porcentaje de uniones peptídicas clivadas, según fue descripto por Nielsen y col. (2001). La Tabla 8 indica el grado de hidrólisis de los extractos de manoproteínas. En la misma se aprecia que todos presentaron un aumento en la cantidad de grupos aminos libres luego del tiempo de incubación. Se puede apreciar que el GH varió desde un valor mínimo de 4,0 % para el extracto obtenido de *C. famata* DBFIQ L17 hidrolizado con pepsina, y un valor máximo con de 62,4 % para el extracto de manoproteínas obtenido de *P. anomala* LTW6 hidrolizado con tripsina/quimotripsina. Además se aprecia que los extractos doblemente hidrolizados (con quimotripsina más una de la restantes enzimas proteolíticas) presentaron mayor grado de hidrólisis que los extractos hidrolizados con una sola enzima.

**Tabla 8:** Determinación del grado de hidrólisis de las distintas manoproteínas sometidas a diferentes tratamientos enzimáticos

Extractos de Manoproteínas	Grado de hidrólisis porcentual (GH)					
	Enzimas proteolíticas					
	tripsina	pepsina	proteínasa K	tripsina/ quimotripsina	pepsina/ quimotripsina	proteínasa K/ quimotripsina
<i>P. anomala</i> LTW6	9,3 ± 3,1	10,1 ± 0,6	17,1 ± 2,3	62,4 ± 8,3	60,0 ± 6,4	61,4 ± 5,7
<i>C. blankii</i> LTW7	17,0 ± 3,0	12,7 ± 4,0	5,2 ± 1,0	60,0 ± 5,0	59,0 ± 9,2	55,0 ± 3,4
<i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2	14,2 ± 1,0	14,5 ± 0,8	11,0 ± 2,5	35,8 ± 5,4	48,7 ± 9,0	50,0 ± 7,0
<i>B. intermedius</i> DBFIQ L12	5,5 ± 0,6	10,4 ± 1,2	11,7 ± 4,0	28,0 ± 2,8	23,1 ± 1,6	26,7 ± 6,0
<i>C. famata</i> DBFIQ L17	14,5 ± 0,4	4,0 ± 0,4	12,2 ± 0,6	25,7 ± 3,0	20,1 ± 1,0	24,2 ± 5,4

Los porcentajes de hidrólisis fueron calculados con un intervalo de confianza del 95 %. Los resultados representan medias ± SD de tres experimentos independientes.

Correlacionando estos datos con los presentados en las Figuras 4 a 8, donde se muestran los resultados de SDS-PAGE para todos los extractos hidrolizados de manoproteínas, se puede inferir la formación de péptidos o glicopéptidos en cada extracto hidrolizado con un PM menor a 6,5 kDa.

En función de los resultados detallados previamente, se consideró importante estudiar la potencial actividad biológica de los péptidos o glicopéptidos resultantes de la hidrólisis de las manoproteínas en ensayo. Para ello se evaluó la actividad inhibitoria frente a la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y frente a la enzima convertidora de angiotensina (ECA), y también, se determinó la actividad antibacteriana empleando como blanco bacterias Gram-positivas y Gram-negativas causantes de enfermedades de transmisión alimentaria y/o alterantes de alimentos.

## **SCREENING DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA FRENTE A LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA**

---

La hipertensión es uno de los mayores factores de riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Kannel, 1996), que afectan a una considerable parte de la población adulta mundial. La búsqueda de medidas preventivas para la hipertensión relacionadas con la dieta es de interés dentro del alcance de los alimentos funcionales (Li y col., 2004). Los científicos han explorado diversos productos alimenticios desde la perspectiva de su funcionalidad, como potenciales fuentes de compuestos bioactivos naturales con beneficios fisiológicos que pueden reducir el riesgo de enfermedades crónicas. Ciertos péptidos obtenidos a partir de hidrolizados de proteínas alimentarias pueden tener actividad inhibitoria frente a la enzima convertidora de angiotensina, lo que es un mecanismo clave para prevenir un incremento en la presión sanguínea. Tales péptidos tienen un valor promisorio para ser utilizados con fines terapéuticos para prevenir la hipertensión.

En la Tabla 9 se observan los resultados de actividad inhibitoria frente a ECA de todos los extractos de manoproteínas hidrolizados obtenidos en este estudio, ensayados a tres concentraciones distintas (5; 2,5 y 1,25 mg ml<sup>-1</sup>).

**Tabla 9:** Actividad inhibitoria frente a ECA de todos los hidrolizados de manoproteínas

Inhibición de ECA (%)						
Extractos de levaduras	Enzimas proteolíticas					
	tripsina			tripsina + quimotripsina		
	5 mg ml <sup>-1</sup>	2,5 mg ml <sup>-1</sup>	1,25 mg ml <sup>-1</sup>	5 mg ml <sup>-1</sup>	2,5 mg ml <sup>-1</sup>	1,25 mg ml <sup>-1</sup>
<i>P. anomala</i> LTW6	5,0 ± 1,2	N.I.	N.I.	11,8 ± 1,1	4,6 ± 1,2	4,0 ± 1,6
<i>C. blankii</i> LTW7	7,0 ± 0,4	N.I.	8,7 ± 2,5	N.I.	N.I.	N.I.
<i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2	3,2 ± 0,8	2,9 ± 0,3	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
<i>B. intermedius</i> DBFIQ L12	4,6 ± 1,4	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	3,2 ± 0,7
<i>C. famata</i> DBFIQ L17	12,8 ± 0,7	7,3 ± 1,8	3,1 ± 0,8	13,4 ± 2,4	3,8 ± 1,4	N.I.
Extractos de levaduras	pepsina			pepsina + quimotripsina		
	5 mg ml <sup>-1</sup>	2,5 mg ml <sup>-1</sup>	1,25 mg ml <sup>-1</sup>	5 mg ml <sup>-1</sup>	2,5 mg ml <sup>-1</sup>	1,25 mg ml <sup>-1</sup>
	<i>P. anomala</i> LTW6	N.I.	N.I.	0,9 ± 0,2	5,4 ± 0,6	5,2 ± 1,4
<i>C. blankii</i> LTW7	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
<i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2	N.I.	N.I.	N.I.	19,7 ± 1,4	6,6 ± 0,4	5,7 ± 2,3
<i>B. intermedius</i> DBFIQ L12	12,4 ± 0,8	4,7 ± 0,4	N.I.	12,9 ± 2,0	14,8 ± 0,5	N.I.
<i>C. famata</i> DBFIQ L17	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
Extractos de levaduras	proteínasa K			proteínasa K + quimotripsina		
	5 mg ml <sup>-1</sup>	2,5 mg ml <sup>-1</sup>	1,25 mg ml <sup>-1</sup>	5 mg ml <sup>-1</sup>	2,5 mg ml <sup>-1</sup>	1,25 mg ml <sup>-1</sup>
	<i>P. anomala</i> LTW6	15,3 ± 17	N.I.	N.I.	16,2 ± 1,3	5,3 ± 1,7
<i>C. blankii</i> LTW7	2,1 ± 0,6	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
<i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
<i>B. intermedius</i> DBFIQ L12	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	3,5 ± 1,7	N.I.
<i>C. famata</i> DBFIQ L17	12,8 ± 2,5	5,6 ± 1,4	N.I.	13,4 ± 1,0	8,0 ± 2,6	7,8 ± 3,1

N.I.: No Inhibió. Los porcentajes de inhibición fueron calculados con un intervalo de confianza del 95 %. Captopril 0,04 μmol l<sup>-1</sup>: actividad inhibitoria frente a ECA del 95 ± 3,6 %.

En la Tabla precedente se puede apreciar que sólo logró detectarse una ligera inhibición producida por algunos de los extractos peptídicos, con valores de

actividad que no superaron el 20 % de inhibición. Estos resultados demuestran que ninguno de los extractos hidrolizados de manoproteínas obtenidos es un buen inhibidor de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina.

Tampoco pudo establecerse ninguna correlación entre las diferentes concentraciones de hidrolizados ensayadas y la capacidad inhibitoria de la ECA, dado que las relaciones observadas resultaron totalmente aleatorias.

Es importante destacar que en la bibliografía consultada no se han encontrado trabajos científicos que informen acerca de hidrolizados de manoproteínas con actividad inhibitoria frente a ECA.

Por otra parte, sí se han hallado estudios sobre otros péptidos obtenidos a partir de levaduras que presentaron actividad inhibitoria frente a ECA. Kanauchi y col. (2005) encontraron extractos peptídicos que inhibían *in vitro* a ECA con valores comprendidos entre 40 y 60 %; los mismos fueron obtenidos por hidrólisis con proteinasas alcalinas de la fracción de la pared celular insoluble obtenida por autolizado de levadura de cerveza. Kohama y col. (1990) aislaron tres péptidos con buena actividad anti-ECA por hidrólisis ácida en caliente de la proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, también obtenida de levadura de cerveza. Por otro lado, Kim y col. (2004) purificaron y caracterizaron un péptido anti-ECA proveniente del extracto libre de células de un cultivo de *S. cerevisiae* hidrolizado con pepsina. Ni y col. (2012) aislaron e identificaron un hexapéptido con actividad antihipertensiva obtenido a partir de hidrólisis enzimática de proteínas solubles en agua extraídas de una cepa de *S. cerevisiae*.

Además, han sido exploradas muchas otras fuentes proteicas para la producción de péptidos con actividad anti-ECA, aplicando hidrólisis enzimática a distintas proteínas tales como: proteínas obtenidas de peces (Raghavan y Kristinsson, 2009; Fahmi y col., 2004; Jung y col., 2006; Wu y col., 2008, Curis y col., 2002), semillas de garbanzo (Yust y col., 2003), gelatina bovina (Herregods y col., 2011), proteínas de ostra (Wang y col., 2008), hidrolizados de gelatina de *Acaudina molpadioidea* (Zhao y col., 2009), caseína (Kim y Chung, 1999; Tauzin y col., 2002), proteínas de lactosuero (Pihlanto-Leppälä y col., 2000; Hernández-Ledesma y col., 2002), proteínas del músculo esquelético porcino (Arihara y col., 2001; Nakashima y col., 2002),

proteínas de huevo de gallina (Yoshii y col., 2001), proteínas del plasma sanguíneo (Wanasundara y col., 2002), entre otras.

## ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

---

### ***Ensayo de actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram (+) y Gram (-)***

El uso de proteínas alimentarias como fuente de péptidos antimicrobianos aparece entre los temas de mayor interés actual en la investigación de moléculas naturales. Durante las últimas décadas, varios estudios informaron acerca de propiedades antimicrobianas de algunas proteínas alimentarias (lisozima, lactoperoxidasa, lactoferrina, entre otras) (Kitts y Weiler, 2003; Pellegrini, 2003), así como de la posibilidad de generar péptidos antimicrobianos por hidrólisis de la proteína precursora *in vivo* o *in vitro* (Clare y col., 2003; López-Expósito y Recio, 2006).

Se realizó la evaluación de la capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias Gram (+) y Gram (-) de todos los extractos de manoproteínas hidrolizados, aplicando el ensayo de difusión en agar (Tagg y McGiven, 1971).

En la Tabla 10 se pueden observar los resultados obtenidos, expresados como diámetros (medidos en mm), de los halos de inhibición generados por los extractos hidrolizados de manoproteínas, sobre la cepa de *L. monocytogenes* tipo I DTUNLu 328. En dicha Tabla se aprecia que un único extracto hidrolizado con una sola enzima resultó activo frente a la cepa bacteriana empleada como blanco, siendo el mismo el extracto de manoproteínas de la cepa de *P. anómala* LTW6 hidrolizado con tripsina.

Además, se observa que los extractos doblemente hidrolizados presentaron una mayor actividad inhibitoria frente a *L. monocytogenes* tipo I DTUNLu 328, con valores de diámetros de halos de inhibición similares (entre 10 y 14 mm). Estos extractos de manoproteínas fueron los de *C. blankii* LTW7, *S. cerevisiae* DBFIQ L2 y *B. intermedius* DBFIQ L12, hidrolizados con tripsina/quimotripsina, y los de *C. blankii* LTW7, *C. famata* DBFIQ L17, *P. anomala* LTW6 y *B. intermedius* DBFIQ L12, hidrolizados con pepsina/quimotripsina.



**Tabla 10:** Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidrolizados de manoproteínas frente a *L. monocytogenes* tipo I DTUNLu 328

<b>Método de difusión en agar. Diámetros de halos de inhibición (mm)</b>						
<b>Bacteria blanco</b>		<i>Listeria monocytogenes</i> tipo I DTUNLu 328				
<b>Extractos de levadura</b>	<b>Extractos hidrolizados con</b>					
	<b>tripsina</b>	<b>tripsina / quimotripsina</b>	<b>pepsina</b>	<b>pepsina/ quimotripsina</b>	<b>proteínasa K</b>	<b>proteínasa K/ quimotripsina</b>
<i>P. anomala</i> LTW6	7	N.I.	N.I.	12	N.I.	N.I.
<i>C. blankii</i> LTW7	N.I.	11	N.I.	14	N.I.	N.I.
<i>C. famata</i> DBFIQ L17	N.I.	N.I.	N.I.	10	N.I.	N.I.
<i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2	N.I.	11	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
<i>B. intermedius</i> DBFIQ L12	N.I.	10	N.I.	10	N.I.	N.I.

Diámetro de los pozos: 6 mm. Concentración de la muestra: 1 mg ml<sup>-1</sup>, disueltas en agua MilliQ. N.I.: No Inhibió. Cada ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como promedio de los valores individuales obtenidos.

En la Tabla 11 se observan los resultados de la inhibición lograda sobre la cepa de *Bacillus cereus* DBFIQ B 28 por todos los hidrolizados de manoproteínas ensayados. Se aprecia que dicha cepa blanco resultó fuertemente inhibida por los hidrolizados obtenidos por la acción única de tripsina sobre todos los extractos de manoproteínas estudiados, con valores de diámetros de halos comprendidos entre 14 y 18 mm. En lo que respecta a los extractos hidrolizados únicamente con pepsina y/o proteínasa K, no produjeron ningún efecto inhibitorio sobre esta cepa.

En cambio, todos los extractos doblemente hidrolizados presentaron actividad frente a la cepa de *B. cereus* DBFIQ B 28, pero la misma resultó, en la gran mayoría de los casos, de menor intensidad, con valores de diámetros de halos comprendidos entre 8 y 15 mm.

**Tabla 11:** Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidrolizados de manoproteínas frente a *Bacillus cereus* DBFIQ B 28

<b>Método de difusión en agar. Diámetros de halos de inhibición (mm)</b>						
<b>Bacteria blanco</b>	<i>Bacillus cereus</i> DBFIQ B 28					
<b>Extractos de levadura</b>	<b>Extractos hidrolizados con</b>					
	<b>tripsina</b>	<b>tripsina/ quimotripsina</b>	<b>pepsina</b>	<b>pepsina/ quimotripsina</b>	<b>proteínasa K</b>	<b>proteínasa K/ quimotripsina</b>
<i>P. anomala</i> LTW6	17	11	N.I.	10	N.I.	11
<i>C. blankii</i> LTW7	18	12	N.I.	11	N.I.	11
<i>C. famata</i> DBFIQ L17	17	9	N.I.	8	N.I.	13
<i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2	17	12	N.I.	14	N.I.	9
<i>B. intermedius</i> DBFIQ L12	14	14	N.I.	13	N.I.	15

Diámetro de los pozos: 6 mm. Concentración de la muestra: 1 mg ml<sup>-1</sup>, disueltas en agua MilliQ. N.I.: No Inhibió. Cada ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como promedio de los valores individuales obtenidos.

Las cepas de *Escherichia coli* DBFIQ Ec 9 y de *Staphylococcus aureus* DBFIQ S 21 no fueron inhibidas por ninguno de los extractos hidrolizados de manoproteínas obtenidos con las diferentes enzimas proteolíticas empleadas (datos no mostrados).

En la bibliografía consultada no se han encontrado informes relacionados a la presencia de péptidos derivados de la hidrólisis de manoproteínas obtenidas de cepas de levaduras que presentasen actividad antimicrobiana.

### **Determinación del modo de acción**

Para la determinación del modo de acción mediante el estudio de la cinética de crecimiento sobre poblaciones celulares proliferantes de las cepas sensibles, se eligieron dos extractos manoproteínicos que presentaron actividad

antimicrobiana. Los mismos fueron el de la cepa de *C. blankii* LTW7 y el de la cepa de *P. anomala* LTW6, ambos hidrolizados con tripsina.

### **Cinética de crecimiento de *Bacillus cereus* DBFIQ B 28**

Se seleccionó el extracto de manoproteínas de *C. blankii* LTW7 hidrolizado con tripsina, que fue activo frente a la cepa de *B. cereus* DBFIQ B 28 en los ensayos previamente efectuados por el método de difusión en agar, para determinar la cinética de crecimiento, en ausencia y en presencia de dicho extracto.

En la Tabla 12 y en la Figura 18 se observan los resultados obtenidos en estos ensayos.

**Tabla 12:** Conteo de células viables por el método de diluciones sucesivas y siembra en placas de Petri

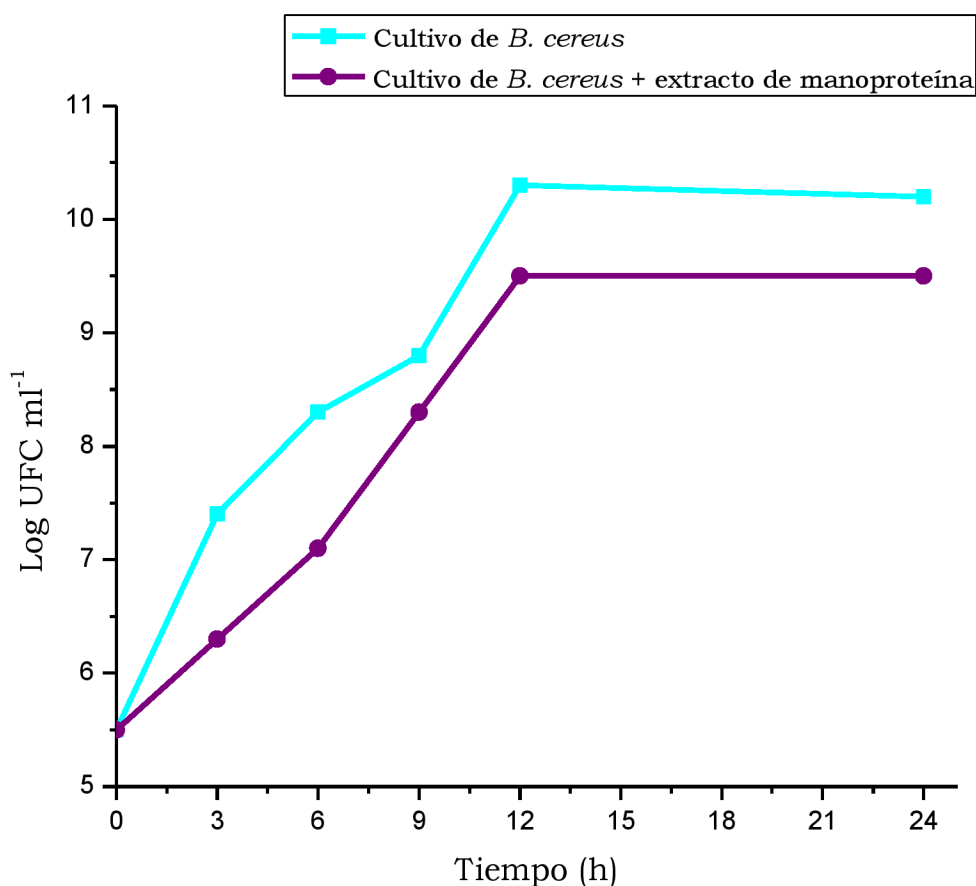
<i>B. cereus</i> DBFIQ B 28		<i>B. cereus</i> DBFIQ B 28 + extracto de manoproteínas de <i>C. blankii</i> LTW7 hidrolizado con tripsina	
Hora	Log UFC ml <sup>-1</sup>	Hora	Log UFC ml <sup>-1</sup>
0	5,5	0	5,5
3	7,4	3	6,3
6	8,3	6	7,1
9	8,8	9	8,3
12	10,3	12	9,5
24	10,2	24	9,5

El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como promedio de los valores individuales obtenidos.

En la Figura 18, así como en la Tabla 12, se puede observar que hubo inhibición en el crecimiento de *B. cereus* DBFIQ B 28 cuando en el medio de cultivo se agregó el extracto de manoproteínas de *C. blankii* LTW7 hidrolizado con la enzima tripsina, en una concentración de 1 mg ml<sup>-1</sup>. Se aprecia un

retardo en el crecimiento de la cepa blanco durante las primeras 12 h de cultivo, siendo este retardo más marcado hasta las 7 - 8 h de incubación, seguido de ausencia de crecimiento a partir de las 12 h y hasta las 24 h. Los resultados obtenidos indican que este extracto presenta efecto inhibitorio sobre la cepa de *B. cereus* DBFIQ B 28, si bien el mismo debe ser considerado como bacteriostático y no como bactericida.

**Figura 18:** Efecto del extracto de manoproteína de *C. blankii* LTW7 hidrolizado con tripsina sobre el crecimiento de *B. cereus* DBFIQ B 28



- Cultivo de *B. cereus* DBFIQ B 28 con el agregado del extracto hidrolizado de manoproteína; ■ Cultivo de *B. cereus* DBFIQ B 28 control.

**Cinética de crecimiento de *Listeria monocytogenes* tipo I DTUNLu 328**

Se seleccionó el extracto de manoproteínas de *P. anomala* LTW6 hidrolizado con tripsina, que fue activo frente a *Listeria monocytogenes* tipo I DTUNLu 328 en los ensayos previamente efectuados por el método de difusión en agar, para determinar la cinética de crecimiento, en ausencia y en presencia de dicho extracto.

En la Tabla 13 y en la Figura 19 se observan los resultados obtenidos en estos ensayos.

**Tabla 13:** Conteo de células viables por el método de diluciones sucesivas y siembra en placas de Petri

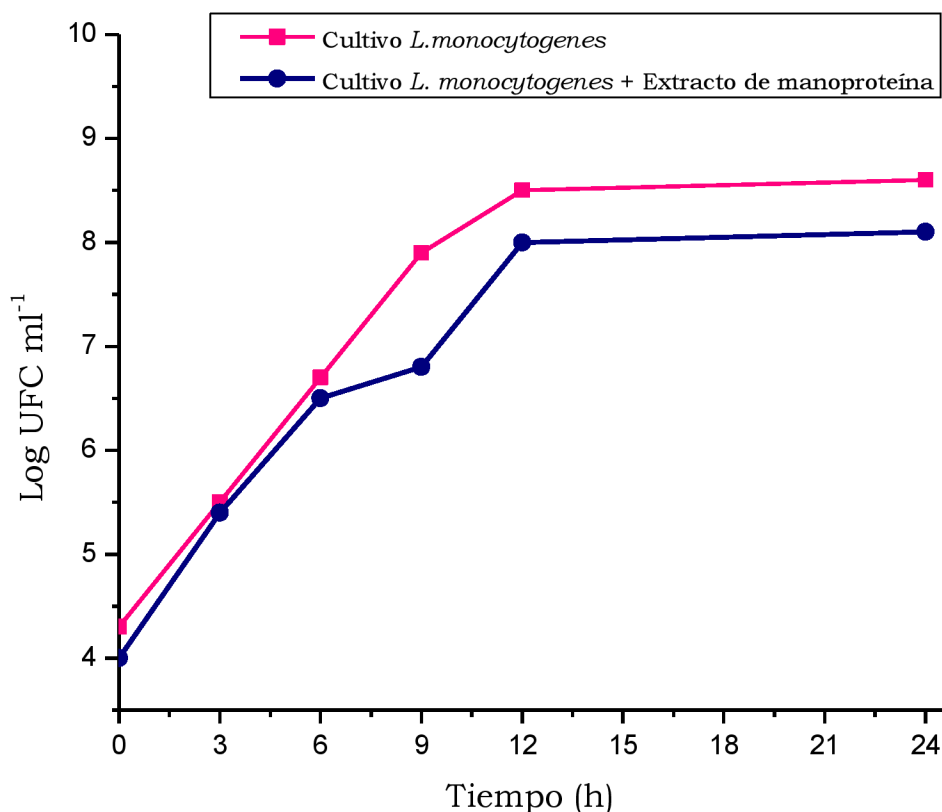
<i>Listeria monocytogenes</i> tipo I DTUNLu 328		<i>L. monocytogenes</i> tipo I DTUNLu 328 + extracto de manoproteínas de <i>P. anomala</i> LTW6 hidrolizado con tripsina	
Hora	Log UFC ml <sup>-1</sup>	Hora	Log UFC ml <sup>-1</sup>
0	4,3	0	4,0
3	5,5	3	5,4
6	6,7	6	6,5
9	7,9	9	6,8
12	8,5	12	8,0
24	8,6	24	8,1

El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como promedio de los valores individuales obtenidos.

En la Figura 19 y en la Tabla 13 se puede apreciar la cinética de crecimiento para *Listeria monocytogenes* tipo I DTUNLu 328. De igual manera que para la cinética de crecimiento de *B. cereus* DBFIQ B 28, se observa que hubo inhibición en el crecimiento de la cepa de *L. monocytogenes* tipo I DTUNLu 328

cuando en el medio de cultivo se agregó el extracto de manoproteínas de *P. anomala* LTW6 hidrolizado con la enzima tripsina, en una concentración de 1 mg ml<sup>-1</sup>. El retardo en el crecimiento de la cepa blanco se manifestó entre las 6 h y las 12 h de cultivo, observándose ausencia de crecimiento a partir de este tiempo y hasta el final del ensayo (24 h). Los resultados obtenidos indican que este extracto presenta efecto inhibitorio sobre la cepa de *L. monocytogenes* tipo I DTUNLu 328, siendo éste definitivamente bacteriostático.

**Figura 19:** Efecto del extracto de manoproteína de *P. anomala* LTW6 hidrolizado con tripsina en el crecimiento de *L. monocytogenes* tipo I DTUNLu 328



- Cultivo de *L. monocytogenes* tipo I DTUNLu 328 con el agregado del extracto hidrolizado de manoproteína; ■ Cultivo de *L. monocytogenes* tipo I DTUNLu 328 control.

## **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA FRENTE A LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA**

---

La actividad catalítica de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en la degradación de acetilcolina (ACh) a colina es de central importancia en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Como un síntoma general de esta enfermedad, la neurotransmisión colinérgica reducida es observada en el cerebro de quienes la padecen (Price, 1986; Kasa y col., 1997). Esta deficiencia observada puede ser causada por una actividad elevada de AChE, resultando en bajos niveles de acetilcolina (Davies y Maloney, 1976; Sims y col., 1983; Dekosky y col., 1992). Por ende, una de las estrategias usadas en el tratamiento en pacientes que presentan la enfermedad de Alzheimer está dirigida a la potenciación de la presencia de acetilcolina en el cerebro por disminución de su velocidad de degradación. Para ello, en la actualidad son ampliamente usados, en pacientes enfermos de Alzheimer, distintos inhibidores de AChE, para evitar la hidrólisis de ACh, activando el sistema colinérgico central y aliviando el déficit cognitivo (Devomoy y col., 2003). Sin embargo, ciertos inhibidores sintetizados químicamente parecen estar dando lugar a efectos secundarios severos tales como náuseas, vómitos, bradicardia, anorexia y sudoración (Giacobini, 2004). Dado que el uso de inhibidores de AChE es uno de los enfoques terapéuticos más eficaces en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la demanda de inhibidores alternativos es alta y es así que han comenzado a tener prioridad las investigaciones con productos naturales, carentes de efectos secundarios.

En este estudio se determinó la capacidad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa de todos los hidrolizados de manoproteínas obtenidos de las distintas cepas de levaduras.

Como primer paso, se realizó un screening preliminar de la actividad anti-acetilcolinesterasa, empleando el método espectrofotométrico descrito por Ellman y col. (1961), que utiliza glóbulos rojos humanos "0" RH (+) como fuente de AChE.

La actividad inhibitoria porcentual frente a AChE de los extractos fue clasificada como potente (>50 % de inhibición), moderada (30-50 % de inhibición), baja (<30 % de inhibición) o nula (<5 % de inhibición), como es sugerido por Vinutha y col. (2007).

En las Tablas 14, 15 y 16 se observan los valores de actividad inhibitoria de la AChE que presentaron todos los extractos hidrolizados en las tres concentraciones ensayadas (5; 2,5 y 1,25 mg ml<sup>-1</sup>).

**Tabla 14:** Screening de la actividad inhibitoria frente a AChE de los hidrolizados de manoproteínas con tripsina y tripsina/quimotripsina

Extractos de levaduras	Ensayo de inhibición de AChE (%)					
	Enzimas proteolíticas					
	Tripsina			tripsina + quimotripsina		
	5 mg ml <sup>-1</sup>	2,5 mg ml <sup>-1</sup>	1,25 mg ml <sup>-1</sup>	5 mg ml <sup>-1</sup>	2,5 mg ml <sup>-1</sup>	1,25 mg ml <sup>-1</sup>
<i>P. anomala</i> LTW6	N.I.	N.I.	N.I.	16,3 ± 2,2	15,6 ± 3,8	18,4 ± 3,8
<i>C. blankii</i> LTW7	42,6 ± 6,0	N.I.	9,0 ± 2,5	39,3 ± 3,2	11,2 ± 4,1	8,6 ± 4,0
<i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2	8,5 ± 1,2	11,8 ± 3,3	16,0 ± 1,4	N.I.	13,3 ± 2,8	N.I.
<i>B. intermedius</i> DBFIQ L12	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	1,8 ± 0,7
<i>C. famata</i> DBFIQ L17	N.I.	4,3 ± 3,8	1,1 ± 0,4	33,8 ± 3,7	13,8 ± 2,4	23,2 ± 1,7

N.I.: No Inhibió. Los porcentajes de inhibición fueron calculados con un intervalo de confianza del 95 %. Control positivo: Galantamina 200 mmol l<sup>-1</sup>; actividad inhibitoria frente a AChE: 94,0 ± 4,5 %.

De los extractos hidrolizados con tripsina, solamente el de *C. blankii* LTW7 presentó una actividad moderada, con un valor de inhibición de 42,6 % a una concentración de 5 mg ml<sup>-1</sup>. Los restantes extractos presentaron baja (< al 20 %) o nula actividad frente a AChE. Además, cuando el extracto de manoproteínas de *C. blankii* LTW7 se hidrolizó con las enzimas tripsina/quimotripsina, su actividad fue ligeramente inferior (39,3 % a 5 mg ml<sup>-1</sup>). De los restantes extractos que fueron hidrolizados con tripsina/quimotripsina, sólo uno de ellos, el de *C. famata* DBFIQ L17, presentó actividad moderada (33,8 %), a una concentración de 5 mg ml<sup>-1</sup>, mientras que cuando fue hidrolizado sólo con tripsina no mostró actividad. Por ende, la



actividad inhibitoria de este extracto se vio aumentada por la doble hidrólisis enzimática. Este aumento de la actividad inhibitoria también se observó en el extracto de *P. anomala* LTW6, pero dicha actividad fue baja a las concentraciones ensayadas (< al 20 %).

**Tabla 15:** Screening de la actividad inhibitoria frente a AChE de los hidrolizados de manoproteínas con pepsina y pepsina/quimotripsina

Extractos de levaduras	Ensayo de inhibición de AChE (%)					
	Enzimas proteolíticas					
	pepsina			pepsina + quimotripsina		
	5 mg ml <sup>-1</sup>	2,5 mg ml <sup>-1</sup>	1,25 mg ml <sup>-1</sup>	5 mg ml <sup>-1</sup>	2,5 mg ml <sup>-1</sup>	1,25 mg ml <sup>-1</sup>
<i>P. anomala</i> LTW6	N.I.	N.I.	6,9 ± 2,2	21,5 ± 3,2	29,2 ± 4,4	41,1 ± 5,7
<i>C. blankii</i> LTW7	7,2 ± 5,7	N.I.	12,1 ± 2,6	59,0 ± 4,2	31,6 ± 3,8	46,6 ± 4,2
<i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2	7,6 ± 3,6	N.I.	9,6 ± 3,5	46,3 ± 2,2	46,4 ± 3,4	38,7 ± 4,3
<i>B. intermedius</i> DBFIQ L12	30,6 ± 3,0	N.I.	0,1 ± 0,4	1,7 ± 1,7	14,8 ± 0,5	14,9 ± 2,5
<i>C. famata</i> DBFIQ L17	N.I.	N.I.	N.I.	34,6 ± 5,0	30,9 ± 1,0	19,3 ± 3,4

N.I.: No Inhibió. Los porcentajes de inhibición fueron calculados con un intervalo de confianza del 95 %. Control positivo: Galantamina 200 mmol l<sup>-1</sup>; actividad inhibitoria frente a AChE: 94,0 ± 4,5 %.

En lo que respecta a los extractos hidrolizados con la enzima pepsina, sólo el de la cepa de *B. intermedius* DBFIQ L12 presentó una actividad inhibitoria considerable frente a AChE, con un valor del 30,6 %, a una concentración de 5 mg ml<sup>-1</sup>. En cambio, este mismo extracto hidrolizado con pepsina/quimotripsina disminuyó su valor a menos del 2 % de inhibición, a la misma concentración, por lo que en este caso la actividad anti-acetilcolinesterasa no se vio favorecida por la doble hidrólisis enzimática.

Los restantes extractos presentaron mayor actividad cuando fueron doblemente hidrolizados con pepsina/quimotripsina que cuando lo fueron con

pepsina solamente. El extracto de *P. anomala* LTW6 aumentó su actividad a medida que disminuía su concentración (21,5 %, 29,2 % y 41,1 % a 5; 2,5 y 1,25 mg ml<sup>-1</sup>, respectivamente), lo que podría deberse a problemas de solubilidad o de agregación de los péptidos presentes en este extracto. Este tipo de resultados se observó también en otros extractos de manoproteínas, como los de *B. intermedius* DBFIQ L12 hidrolizado con pepsina/quimotripsina y con proteinasa K/quimotripsina, el de *P. anomala* LTW6 hidrolizado con tripsina/quimotripsina, el de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizado con tripsina y el de *C. blankii* LTW7 hidrolizado con proteinasa K/quimotripsina.

En el caso del extracto de *C. blankii* LTW7, su actividad inhibitoria fue dispar, presentando un valor elevado a una concentración de 5 mg ml<sup>-1</sup> (59 % de inhibición), disminuyendo a 31,6 % a una concentración de 2,5 mg ml<sup>-1</sup> y aumentando a 46,6 % a la concentración más baja ensayada (1,25 mg ml<sup>-1</sup>). En el caso del extracto de *S. cerevisiae* DBFIQ L2, se puede apreciar que su actividad fue buena y similar en todo el rango de concentraciones ensayadas (46,3 %, 46,4 % y 38,7 % a 5; 2,5 y 1,25 mg ml<sup>-1</sup>, respectivamente). Por último, el extracto de *C. famata* DBFIQ L17 presentó valores ligeramente superiores al 30 % a las concentraciones de 5 y 2,5 mg ml<sup>-1</sup>, cuando fue sometido al doble tratamiento enzimático, mostrando en cambio actividad nula luego del tratamiento con pepsina sola.

**Tabla 16:** Screening de la actividad inhibitoria frente a AChE de los hidrolizados de manoproteínas con proteinasa K y proteinasa K/quimotripsina

Extractos de levaduras	Ensayo de inhibición de AChE (%)					
	Enzimas proteolíticas					
	proteinasa K			proteinasa K + quimotripsina		
	5 mg ml <sup>-1</sup>	2,5 mg ml <sup>-1</sup>	1,25 mg ml <sup>-1</sup>	5 mg ml <sup>-1</sup>	2,5 mg ml <sup>-1</sup>	1,25 mg ml <sup>-1</sup>
<i>P. anomala</i> LTW6	N.I.	N.I.	N.I.	21,0 ± 4,2	16,3 ± 5,1	19,4 ± 1,3
<i>C. blankii</i> LTW7	N.I.	N.I.	5,3 ± 1,3	1,7 ± 0,7	8,3 ± 0,8	13,1 ± 5,0
<i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2	54,4 ± 3,1	37,1 ± 3,4	18,5 ± 6,0	32,1 ± 4,5	1,1 ± 0,4	6,7 ± 2,5
<i>B. intermedius</i> DBFIQ L12	7,5 ± 1,0	N.I.	N.I.	5,8 ± 3,0	9,5 ± 3,7	19,2 ± 2,0
<i>C. famata</i> DBFIQ L17	37,3 ± 3,9	N.I.	9,8 ± 2,0	N.I.	9,0 ± 2,5	9,8 ± 4,0

N.I.: No Inhibió. Los porcentajes de inhibición fueron calculados con un intervalo de confianza del 95 %. Control positivo: Galantamina 200 mmol l<sup>-1</sup>; actividad inhibitoria frente a AChE: 94,0 ± 4,5 %.

En lo que concierne a los extractos hidrolizados con la enzima proteinasa K, se obtuvieron valores importantes de inhibición frente a AChE con los de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 (54,5 % y 37,1 % a 5 y 2,5 mg ml<sup>-1</sup>, respectivamente) y de *C. famata* DBFIQ L17 (37,3 % a 5 mg ml<sup>-1</sup>). Cuando estos extractos fueron doblemente hidrolizados con proteinasa K/quimotripsina, su actividad inhibitoria disminuyó considerablemente. En lo que respecta al de *S. cerevisiae* DBFIQ L2, su actividad disminuyó a valores de 32,1 y 1,1 % a las concentraciones de 5 y 2,5 mg ml<sup>-1</sup>, mientras que la actividad del de *C. famata* DBFIQ L17 resultó nula.

Los extractos de *P. anomala* LTW6, *C. blankii* LTW7 y *B. intermedius* DBFIQ L12 no presentaron una actividad inhibitoria importante, con valores que no superaron el 21 %.

A partir de los resultados obtenidos en el screening preliminar de los extractos hidrolizados de manoproteínas, se seleccionaron los que presentaron mayor actividad inhibitoria frente a AChE y se procedió a determinar su concentración inhibitoria 50 (CI50). Para este ensayo se empleó la enzima

acetilcolinesterasa de origen comercial (Sigma, USA) y se utilizó un micrométodo en microplacas de 96 pocillos.

Previamente se comprobó que los resultados obtenidos empleando el micrométodo fueron prácticamente coincidentes con los logrados aplicando el método descrito anteriormente, donde se emplean glóbulos rojos humanos “0” RH (+) como fuente de la enzima acetilcolinesterasa (datos no mostrados). Por esta razón se decidió utilizar el micrométodo para la determinación de CI50, debido a que los resultados son más reproducibles que los obtenidos aplicando el método probado en primera instancia.

Los extractos seleccionados fueron los de *C. blankii* LTW7 hidrolizados con tripsina (42,6 % de inhibición), con tripsina/quimotripsina (39,3 % de inhibición) y con pepsina/quimotripsina (59 % de inhibición); *S. cerevisiae* DBFIQ L2 con proteinasa K (54,4 % de inhibición) y con pepsina/quimotripsina (46,4 % de inhibición); y el de *P. anomala* LTW6 hidrolizado con pepsina/quimotripsina (41,1 % de inhibición).

En la Tabla 17 se detallan los resultados de las determinaciones de CI50.

**Tabla 17:** Valores de CI50 de la actividad inhibitoria frente a AChE

Extracto de levaduras	Enzimas proteolíticas	CI50 (mg ml <sup>-1</sup> )
<i>C. blankii</i> LTW7	tripsina	12,3 ± 0,3
	tripsina/quimotripsina	14,4 ± 0,8
	pepsina/quimotripsina	11,2 ± 0,6
<i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2	proteinasa K	13,0 ± 0,4
	pepsina/quimotripsina	6,8 ± 0,6
<i>P. anomala</i> LTW6	pepsina/quimotripsina	7,7 ± 0,3

Los porcentajes de inhibición fueron calculados con un intervalo de confianza del 95 %. Control positivo: Galantamina 200 mmol l<sup>-1</sup>; actividad inhibitoria frente a AChE: 91,5 ± 2,7 %.

Como se observa en la Tabla 17, los valores de CI50 variaron entre 6,8 y 14,4 mg ml<sup>-1</sup>, siendo el extracto de *Saccharomyces cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizado con pepsina/quimotripsina el que presentó el menor valor de CI50 frente a AChE.

En la actualidad, existen muy pocos estudios previos de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa utilizando hidrolizados enzimáticos de proteínas alimentarias. Ahn y col. (2010), tuvieron buenos resultados de actividad inhibitoria *in vitro* frente a AChE a partir de diferentes hidrolizados enzimáticos obtenidos de proteínas de hígado de tuna, producidos por enzimas comerciales tales como alcalasa, neutrasa, protamex o flavourzyme. En otro estudio se investigó la actividad inhibitoria del “douchi”, un tradicional alimento de soja chino fermentado, y se observó inhibición frente a AChE, la que en parte fue atribuida a péptidos generados desde las proteínas de soja luego de la fermentación (Liu y col., 2009). De manera similar, Chen y col. (2012) determinaron la existencia de actividad inhibitoria frente a AChE empleando “sufu” chino (fermentado de “tofu”). En un estudio adicional, en el cual se examinó el efecto anti-Alzheimer del salvado de arroz, fueron identificados péptidos bioactivos menores a 5 kDa (Kannan y col., 2012).

Por su parte Mallender y col. (1999) encontraron un péptido neurotóxico presente en el veneno de serpiente, denominado Fasciculina, que inhibe a la enzima acetilcolinesterasa.

Asimismo, Zhang y col. (2006) obtuvieron una serie de péptidos con actividad inhibitoria frente a AChE a partir de una biblioteca de péptidos al azar proveniente de fagos.

### **FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS MÁS ACTIVOS FRENTE A AChE POR CROMATOGRAFÍA EN FASE REVERSA Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA**

---

Como primer paso para el fraccionamiento de cada extracto, se realizó una cromatografía líquida en fase reversa, empleando 4 cartuchos Sep Pack C18 agrupados en tándem. Cada extracto fue eluido a diferentes porcentajes de acetonitrilo (ACN) (2, 15 y 30 %) y posteriormente, cada fracción obtenida fue

concentrada por evaporación en evaporador rotatorio bajo vacío. Por último, las fracciones fueron liofilizadas y conservadas a -4 °C.

A cada una de las 3 fracciones obtenidas para cada extracto de manoproteínas se le determinó la actividad inhibitoria frente a la enzima acetilcolinesterasa. En la Tabla 18 se pueden observar los resultados de dicha inhibición.

**Tabla 18:** Actividad inhibitoria frente a AChE de las fracciones obtenidas por cromatografía en fase reversa

Extractos de levaduras	Enzimas proteolíticas	Actividad Inhibitoria (%)		
		2 % ACN	15 % ACN	30 % ACN
<i>Candida blankii</i> LTW7	tripsina	8,0 ± 0,2	64,0 ± 1,3	N.I.
	tripsina/quimotripsina	N.I.	46,0 ± 0,7	N.I.
	pepsina/quimotripsina	25,0 ± 0,5	64,0 ± 0,6	15,0 ± 0,2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DBFIQ L2	proteínasa K	28,0 ± 0,3	59,0 ± 0,8	16,0 ± 0,7
	pepsina/quimotripsina	17,0 ± 0,4	51,0 ± 0,6	27,0 ± 0,5
<i>Pichia anomala</i> LTW6	pepsina/quimotripsina	59,0 ± 1,1	35,0 ± 1,0	11,0 ± 0,4

N.I.: No inhibió. Los porcentajes de inhibición fueron calculados con un intervalo de confianza del 95 %. Control positivo: Galantamina 200 mmol l<sup>-1</sup>; actividad inhibitoria frente a AChE: 92,0 ± 1,4 %. Concentración de cada fracción: 5 mg ml<sup>-1</sup>.

Puede apreciarse en la Tabla 18 que las fracciones más activas fueron las obtenidas por elución con 15 % de ACN, a excepción de la fracción obtenida al 2 % de ACN para el extracto de manoproteínas de *P. anomala* LTW6 hidrolizado con pepsina/quimotripsina. Los valores de inhibición para las fracciones más activas estuvieron comprendidos entre 46 y 64 %, siendo los más activos los extractos de manoproteínas de *C. blankii* LTW7 hidrolizados tanto con tripsina como con pepsina/quimotripsina.

## **ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES MÁS ACTIVAS POR HPLC, HPAEC-PAD Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF**

---

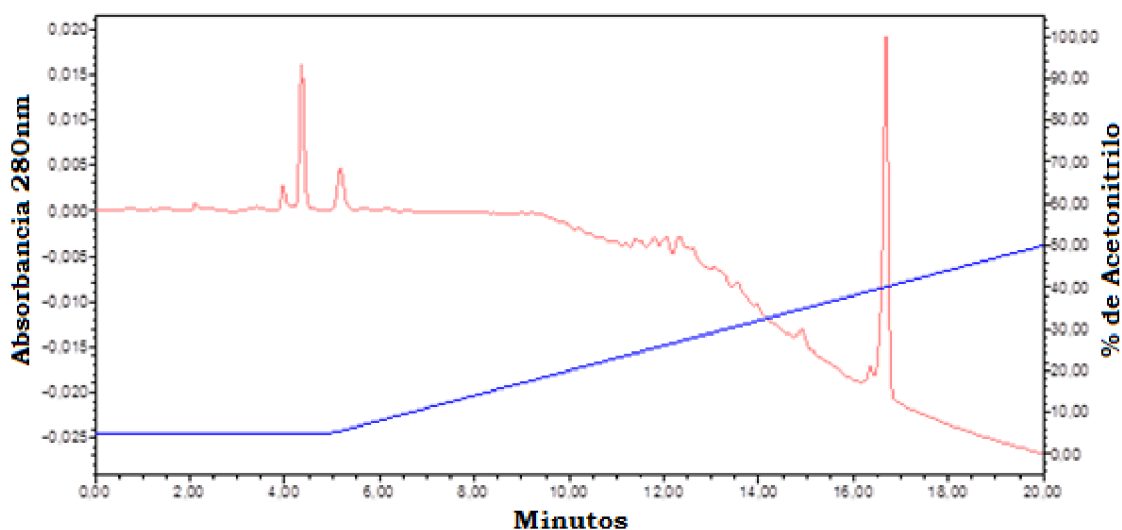
Las fracciones que presentaron mayores valores de inhibición frente a la enzima acetilcolinesterasa, obtenidas por cromatografía líquida en fase reversa utilizando columnas Sep Pack C18 en tándem, fueron analizadas por Cromatografía Líquida de Alta Performance, Cromatografía de Alto Rendimiento de Intercambio Aniónico con Detección Amperométrica Pulsada y por Espectrometría de Masas MALDI-TOF.

Las fracciones fueron las siguientes: los extractos de manoproteínas de *C. blankii* LTW7 hidrolizados con tripsina, tripsina/quimotripsina y pepsina/quimotripsina, eluidos al 15 % de ACN; los extractos de manoproteínas de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizados con proteinasa K y pepsina/quimotripsina, eluidos al 15 % de ACN, y el extracto de manoproteínas de *P. anomala* LTW6 hidrolizado con pepsina/quimotripsina, eluido al 2 % de ACN.

### **Fracción del extracto de manoproteínas de *Candida blankii* LTW7 hidrolizado con tripsina, eluido al 15 % (v/v) de acetonitrilo**

En la Figura 20 se puede observar el perfil cromatográfico obtenido para la fracción eluida al 15 % (v/v) con ACN del extracto de manoproteínas de *C. blankii* LTW7 hidrolizado con tripsina.

**Figura 20:** Perfil cromatográfico de HPLC en fase reversa de la fracción obtenida utilizando cartuchos Sep Pack C18, eluida con ACN al 15 % (v/v), del extracto de *C. blankii* LTW7 hidrolizado con tripsina

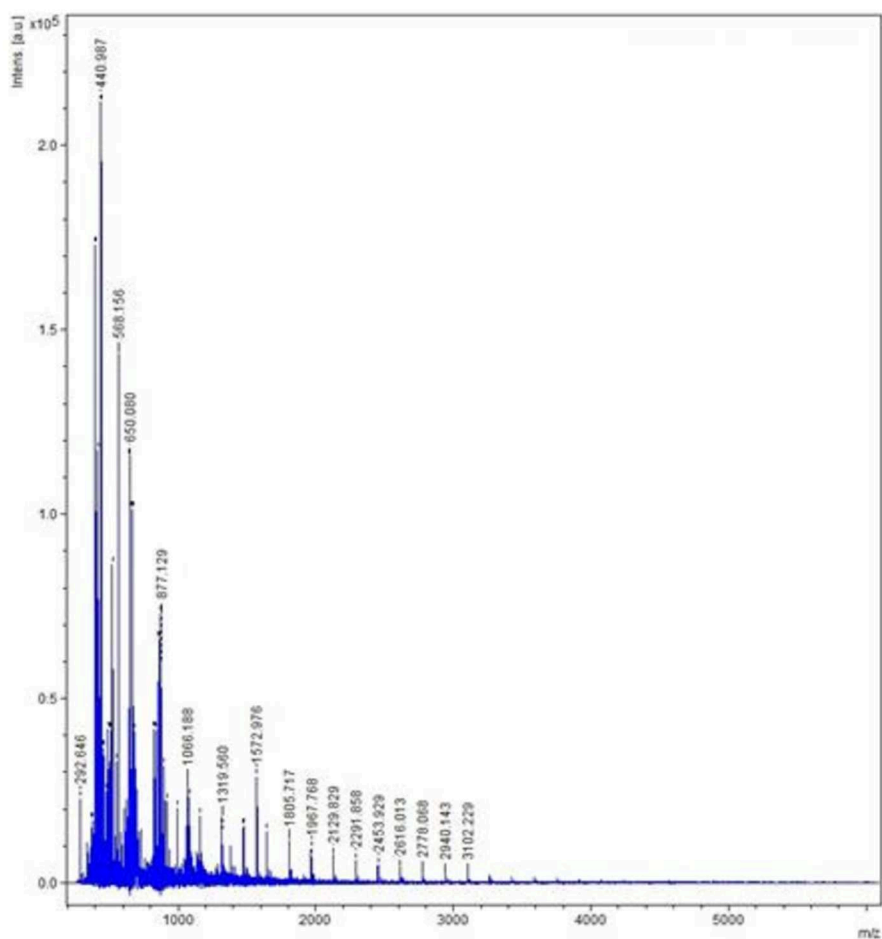


Columna: Beckman C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm x 260 mm. Tiempo de corrida: 20 min. Gradiente 5-50 % ACN. Detección UV a 280 nm.

En el perfil cromatográfico se puede apreciar la presencia de un pico mayoritario que eluye al 40 % de ACN con un tiempo de retención ( $t_r$ ) de 16,5 minutos. Además, se percibe una serie de picos al inicio del cromatograma que eluyen con un 5 % de ACN, con un  $t_r$  de entre 4 y 5,5 minutos. Esta fracción no es retenida, es decir que no interacciona con la columna de C18.



**Figura 21:** Espectro de Masas de MALDI-TOF de la fracción eluida al 15 % de ACN del extracto de *C. blankii* LTW7 hidrolizado con tripsina



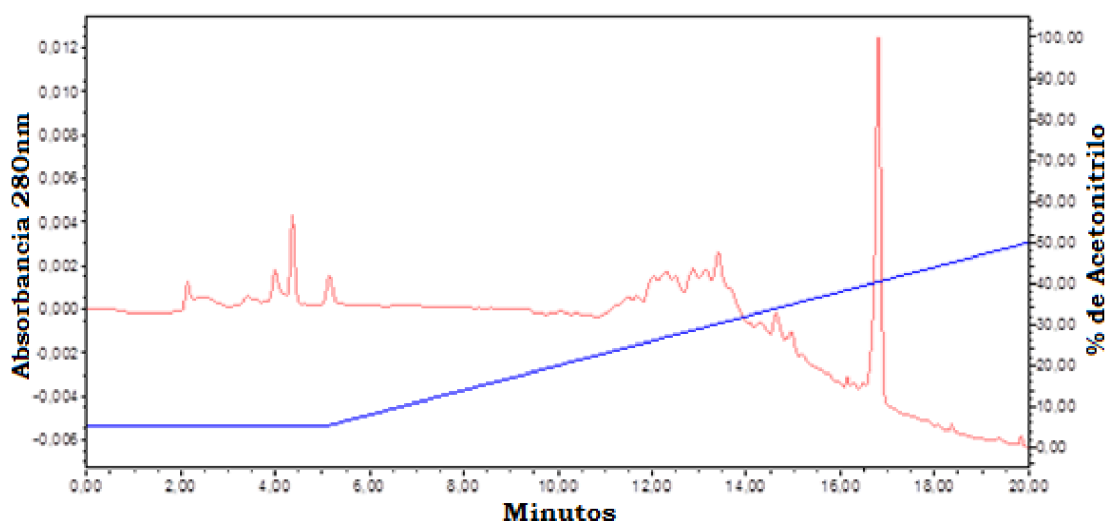
Se observa la presencia de 6 iones mayoritarios con los siguientes m/z: 825,179 Da; 855,143 Da; 861,160 Da; 877,129 Da; 1066,188 Da y 1572,976 Da.

La fracción eluida al 15 % de ACN del extracto de *C. blankii* LTW7 hidrolizado con tripsina fue analizada por Espectrometría de Masas MALDI-TOF (Figura 21). Como se aprecia en la Figura, se detectó la presencia de 6 iones mayoritarios con los siguientes m/z: 825,179 Da; 855,143 Da; 861,160 Da; 877,129 Da; 1066,188 Da y 1572,976 Da.

### Fracción del extracto de manoproteínas de *Candida blankii* LTW7 hidrolizado con tripsina/quimotripsina, eluido al 15 % de acetonitrilo

En la Figura 22 se puede observar el perfil cromatográfico obtenido para la fracción eluida con el 15 % (v/v) de ACN del extracto de manoproteínas de *C. blankii* LTW7 doblemente hidrolizado con las enzimas tripsina/quimotripsina.

**Figura 22:** Perfil cromatográfico de HPLC en fase reversa de la fracción obtenida utilizando cartuchos Sep Pack C18, eluida con ACN al 15 % (v/v), del extracto *C. blankii* LTW7 hidrolizado con tripsina/quimotripsina



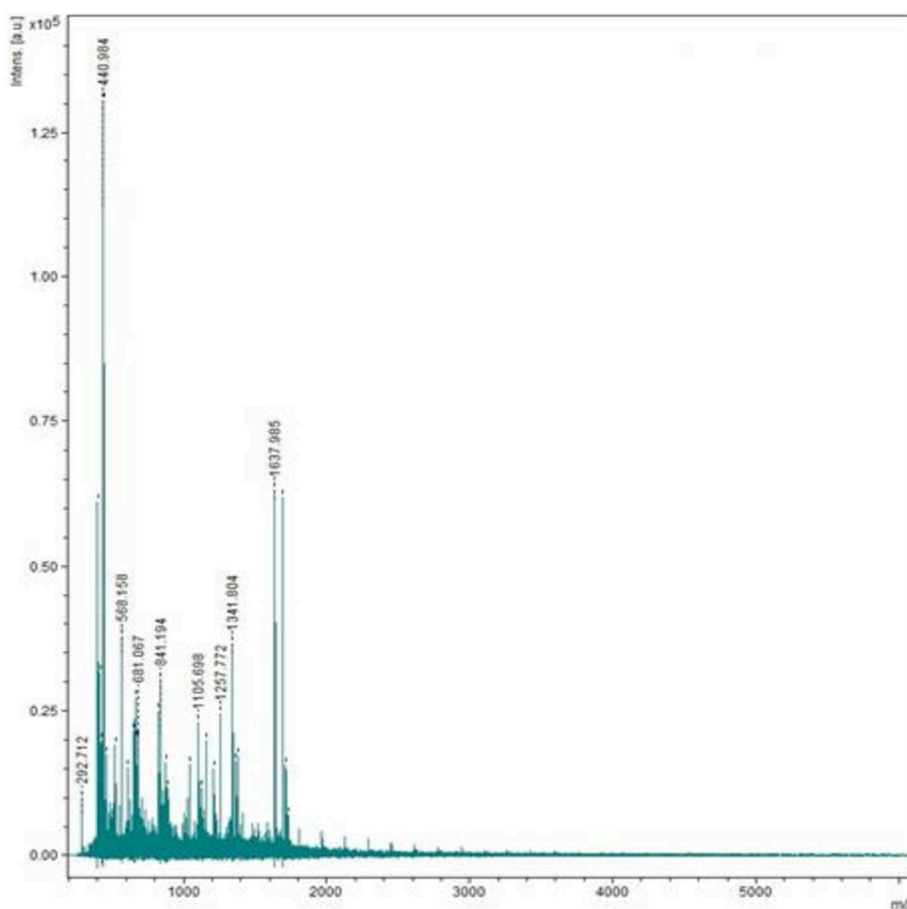
Columna: Beckman C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm x 260 mm. Tiempo de corrida: 20 min. Gradiente 5-50 % ACN. Detección UV a 280 nm.

En la Figura se puede apreciar la presencia de un pico mayoritario que eluye al 40 % de ACN con un  $t_r$  de 16,5 minutos. Este pico es similar al encontrado en la fracción al 15 % (v/v) con ACN del extracto de manoproteínas de *C. blankii* LTW7 hidrolizado con tripsina (ver Figura 9). Esto sugeriría que este pico podría pertenecer a una fracción peptídica obtenida de la hidrólisis única de tripsina sobre el extracto manoproteínico de esta levadura.

También se observan una serie de picos al inicio del cromatograma que eluyen con un 5 % de ACN con un  $t_r$  de entre 4 y 5,5 min, los cuales no fueron retenidos por la columna. Esta fracción también es similar a la encontrada en la fracción eluida al 15 % (v/v) con ACN del extracto de manoproteínas de *C. blankii* LTW7 hidrolizado con tripsina. Esto también confirma la sugerencia de que esta fracción podría pertenecer a fragmentos peptídicos obtenidos de la hidrólisis única de tripsina sobre el extracto manoproteínico de esta levadura.

Otra fracción con pequeños picos no muy bien definidos puede verse con un  $t_r$  de entre 11 y 15 min, comenzando a eluir con un porcentaje de ACN del 25 %. Estos picos se pueden deber a la presencia de agregados peptídicos en la fracción.

**Figura 23:** Espectro de Masas de MALDI-TOF de la fracción eluida al 15 % de ACN del extracto de *C. blankii* LTW7 hidrolizado con tripsina/quimotripsina



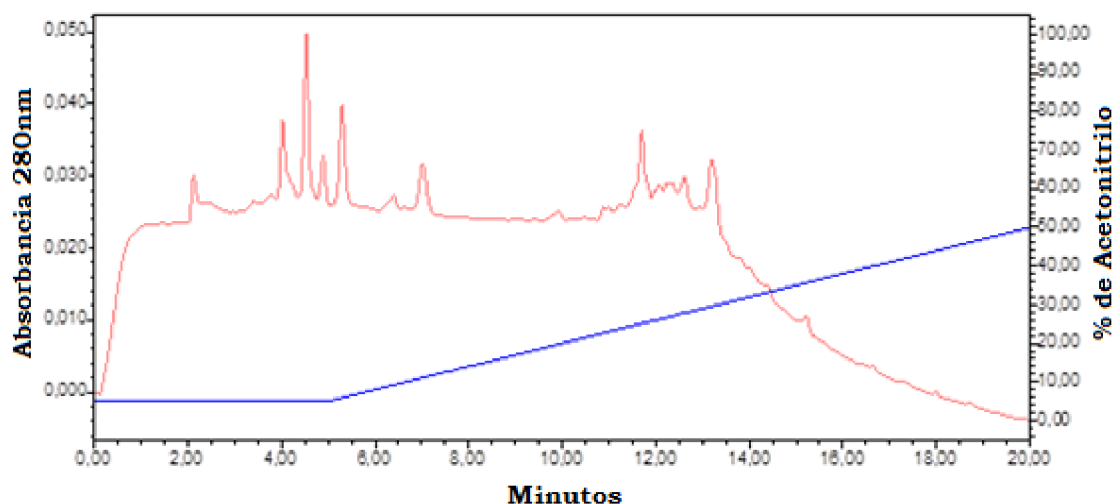
Se observa la presencia de 6 iones mayoritarios con los siguientes  $m/z$ : 841,194 Da; 1105,698 Da; 1257,772 Da; 1341,804 Da; 1637,985 Da y 1691,888 Da.

La fracción eluida al 15 % de ACN del extracto de *C. blankii* LTW7 hidrolizado con tripsina/quimotripsina fue analizada por Espectrometría de Masas MALDI-TOF (Figura 23). Se detectó la presencia de 6 iones mayoritarios con los siguientes m/z: 841,194 Da; 1105,698 Da; 1257,772 Da; 1341,804 Da; 1637,985 Da y 1691,888 Da.

**Fracción del extracto de manoproteínas de *Candida blankii* LTW7 hidrolizado con pepsina/quimotripsina eluido al 15 % (v/v) de acetonitrilo**

En la figura 24 se puede observar el perfil cromatográfico obtenido por HPLC para la fracción eluida con el 15 % de ACN, proveniente del extracto de *C. blankii* LTW7 hidrolizado con pepsina/quimotripsina.

**Figura 24:** Perfil cromatográfico de HPLC en fase reversa de la fracción obtenida utilizando cartuchos Sep Pack C18, eluida con ACN al 15 % (v/v), del extracto *C. blankii* LTW7 hidrolizado con pepsina/quimotripsina

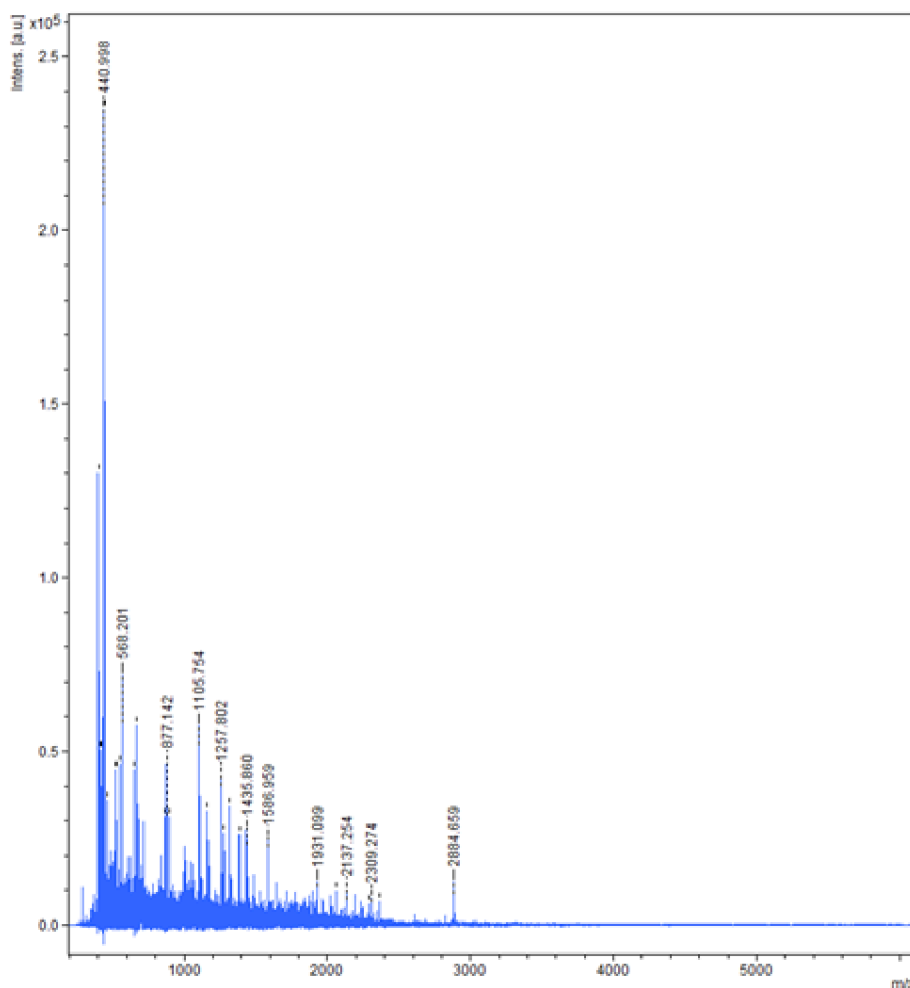


Columna: Beckman C18, 5 µm, 4,6 mm x 260 mm. Tiempo de corrida: 20 min. Gradiente 5-50 % ACN. Detección UV a 280 nm.

Se aprecian 3 principales fracciones con varios picos. La primera fracción, con 4 picos principales, posee un  $t_r$  entre 4 y 5,5 min y eluye con un porcentaje de ACN del 5 %. Esta fracción no interacciona con la columna de C18.

La segunda fracción presenta dos picos, tiene un  $t_r$  entre 6 y 7,2 min y comienza a eluir al 8 % de ACN. La tercera fracción, con picos menos definidos, presenta un  $t_r$  entre 11 y 13,5 min y comienza a eluir a un porcentaje de ACN del 25 %.

**Figura 25:** Espectro de Masas de MALDI-TOF de la fracción eluida al 15 % de ACN del extracto de *C. blankii* LTW7 hidrolizado con pepsina/quimotripsina



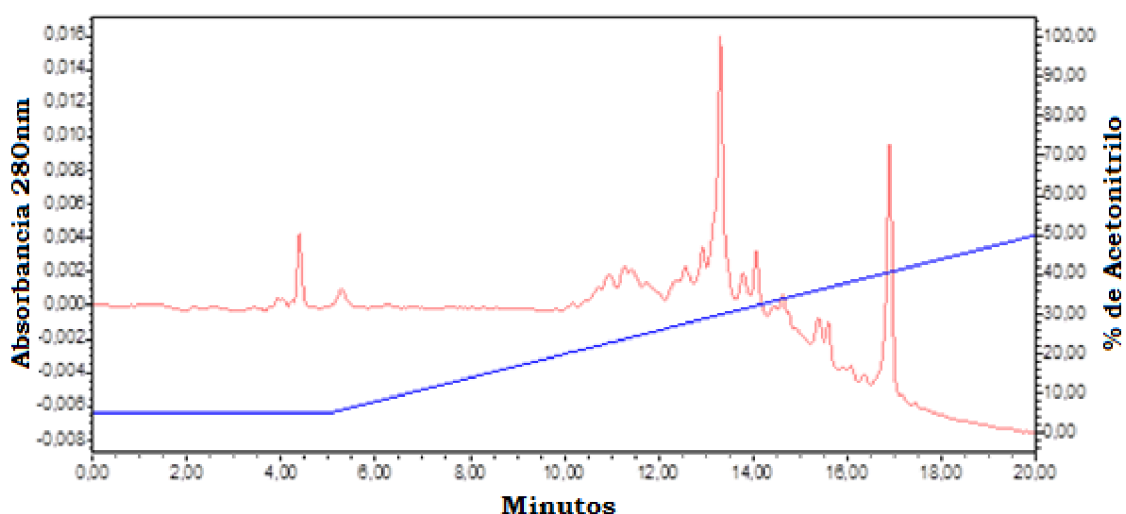
Se observa la presencia de 9 iones mayoritarios con los siguientes  $m/z$ : 877,142 Da; 1105,754 Da; 1257,802 Da; 1314,838 Da; 1385,874 Da; 1435,860 Da; 1586,959 Da; 1931,099 Da y 2884,659 Da.

La fracción eluida al 15 % de ACN fue analizada por Espectrometría de Masas MALDI-TOF (Figura 25), detectándose la presencia de 9 iones mayoritarios con los siguientes  $m/z$ : 877,142 Da; 1105,754 Da; 1257,802 Da; 1314,838 Da; 1385,874 Da; 1435,860 Da; 1586,959 Da; 1931,099 Da y 2884,659 Da.

**Fracción del extracto de manoproteínas de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizado con proteinasa K eluido al 15 % (v/v) de acetonitrilo**

En la figura 26 se observa el perfil cromatográfico de HPLC en fase reversa de la fracción del extracto de manoproteínas de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizado con proteinasa K y eluido con el 15 % de ACN.

**Figura 26:** Perfil cromatográfico de HPLC en fase reversa de la fracción obtenida utilizando cartuchos Sep Pack C18, eluida con ACN al 15 % (v/v), del extracto *S. cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizado con proteinasa K

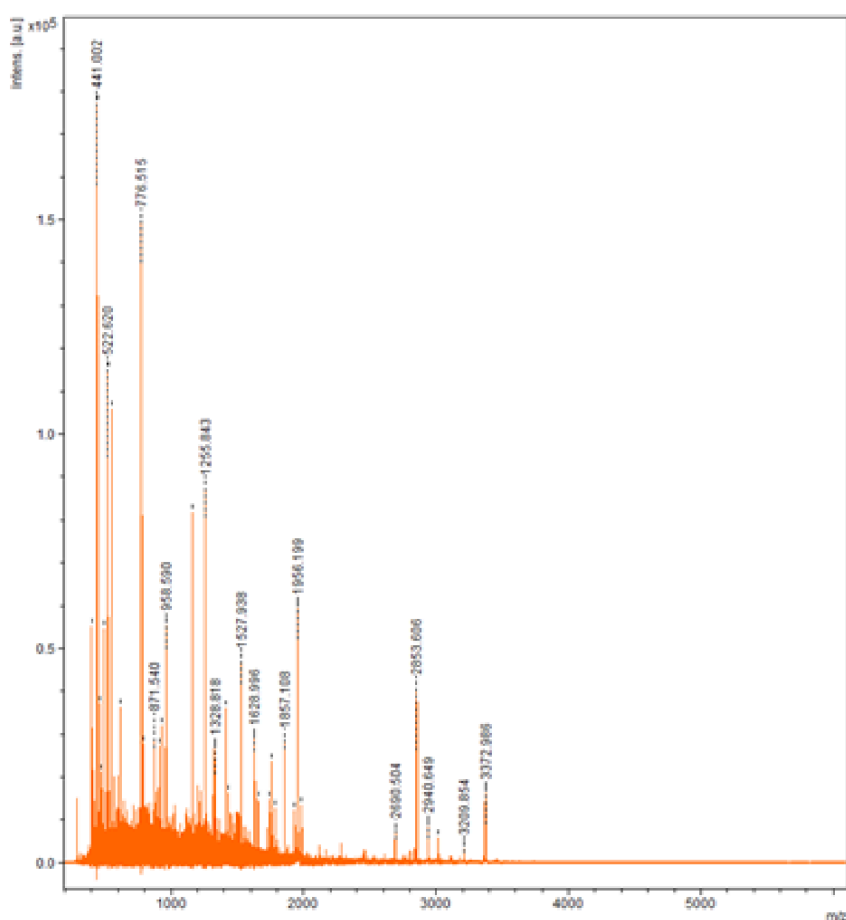


Columna: Beckman C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm x 280 mm. Tiempo de corrida: 20 min. Gradiente 5-50 % ACN. Detección UV a 280 nm.

Se destaca la presencia de 2 picos principales. El primero posee un  $t_r$  de 13,25 min y eluye con un porcentaje de ACN del 30 %. El segundo pico tiene un  $t_r$  de 17 min y eluye con un porcentaje de ACN del 42 %. Además, se observan

diferentes zonas con picos más pequeños. La primera con  $t_r$  entre 4 y 5,5 min, eluyendo con 5 % de ACN (fracción no retenida por la columna). La segunda zona posee un  $t_r$  entre 10,5 y 13 min y eluye entre 20 y 28 % de ACN y, por último, la tercera zona tiene un  $t_r$  entre 13,5 y 16,5 min y eluye entre 33 y 40 % de ACN.

**Figura 27:** Espectro de Masas de MALDI-TOF de la fracción eluida al 15 % de ACN del extracto de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizado con proteinasa K



Se observa la presencia de 7 iones mayoritarios con los siguientes  $m/z$ : 776,515 Da; 958,590 Da; 1157,712 Da; 1255,843 Da; 1527,938 Da; 1956,199 Da y 2853,606 Da.

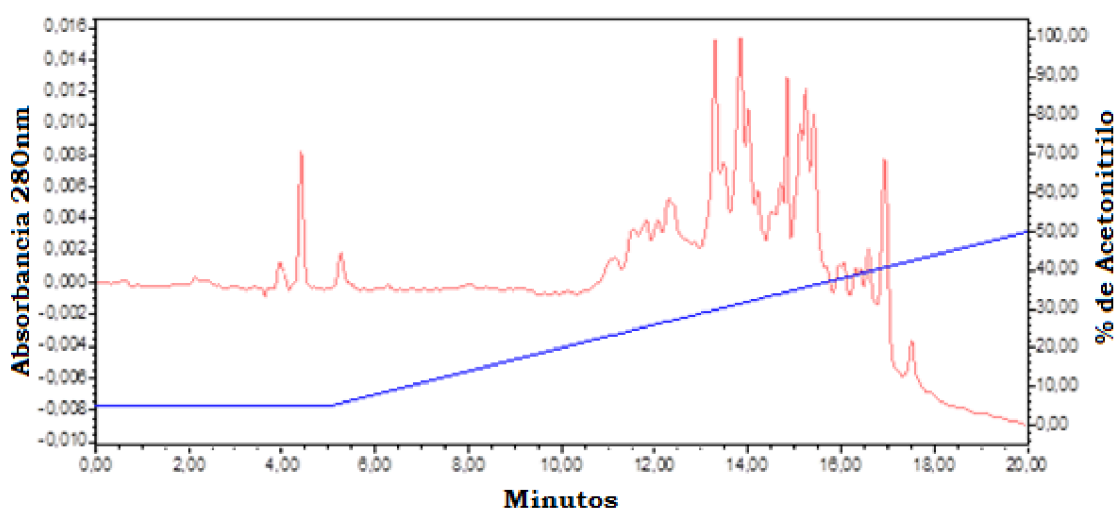
El espectro de Masas MALDI-TOF correspondiente a la fracción eluida al 15 % de ACN del extracto de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizado con proteinasa K

permitió detectar la presencia de 7 iones mayoritarios con los siguientes m/z: 776,515 Da; 958,590 Da; 1157,712 Da; 1255,843 Da; 1527,938 Da; 1956,199 Da y 2853,606 Da (Figura 27).

**Fracción del extracto de manoproteínas de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizado con pepsina/quimotripsina, eluido al 15 (v/v) % de acetonitrilo**

El perfil cromatográfico obtenido por HPLC para la fracción eluida al 15 % (v/v) de ACN del extracto de manoproteínas de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizado con pepsina/quimotripsina se muestra en la Figura 28.

**Figura 28:** Perfil cromatográfico de HPLC en fase reversa de la fracción obtenida utilizando cartuchos Sep Pack C18, eluida con ACN al 15 % (v/v), del extracto *S. cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizado con pepsina/quimotripsina



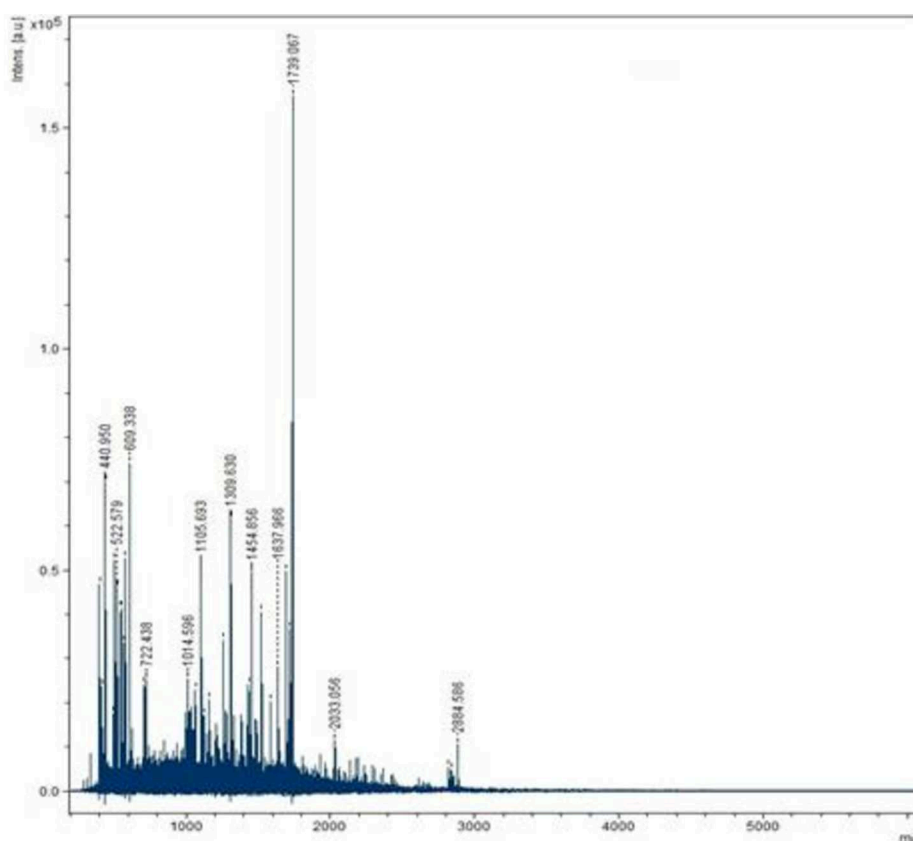
Columna: Beckman C18, 5  $\mu$ m, 4,6 mm x 260 mm. Tiempo de corrida: 20 min. Gradiente 5-50 % ACN. Detección UV a 280 nm.

En el cromatograma se puede observar una fracción pequeña no retenida por la columna, que sale con tr entre 4 y 5,5 min, con un porcentaje de elución del 5 % (v/v) de ACN. Luego se aprecia una zona más amplia, con varios picos no



muy bien definidos, que posee un  $t_r$  entre 11 y 18 min, que comienza a eluir con 24 % de ACN y finaliza con 45 % de ACN.

**Figura 29:** Espectro de Masas de MALDI-TOF de la fracción eluida al 15 % de ACN del extracto de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizado con pepsina/quimotripsina



Se observa la presencia de 9 iones mayoritarios con los siguientes  $m/z$ : 1105 Da; 1257,736 Da; 1309,630 Da; 1454,856 Da; 1523,948 Da; 1637,966 Da; 1691,864 Da; 1721,032 Da y 1739,067 Da.

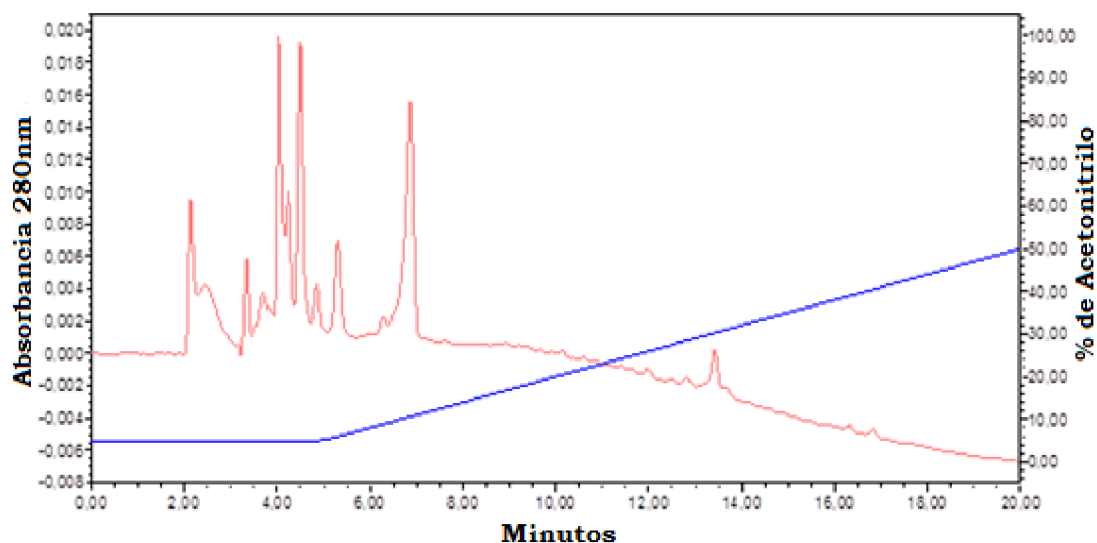
El espectro de Masas MALDI-TOF correspondiente a la fracción eluida al 15 % de ACN del extracto de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizado con pepsina/quimotripsina permitió detectar la presencia de 9 iones mayoritarios con los siguientes  $m/z$ : 1105 Da; 1257,736 Da; 1309,630 Da; 1454,856 Da;

1523,948 Da; 1637,966 Da; 1691,864 Da; 1721,032 Da y 1739,067 Da (Figura 29).

**Fracción del extracto de manoproteínas de *P. anomala* LTW6 hidrolizado con pepsina/quimotripsina, eluido al 2 % (v/v) de acetonitrilo**

En la Figura 30 se puede ver el cromatograma de HPLC en fase reversa de la fracción eluida al 2 % (sin retener) del extracto de *P. anomala* hidrolizado con pepsina/quimotripsina.

**Figura 30:** Perfil cromatográfico de HPLC en fase reversa de la fracción obtenida utilizando cartuchos Sep Pack C18, eluida al 2 % de ACN (sin retener), del extracto *P. anomala* LTW6 hidrolizado con pepsina/quimotripsina

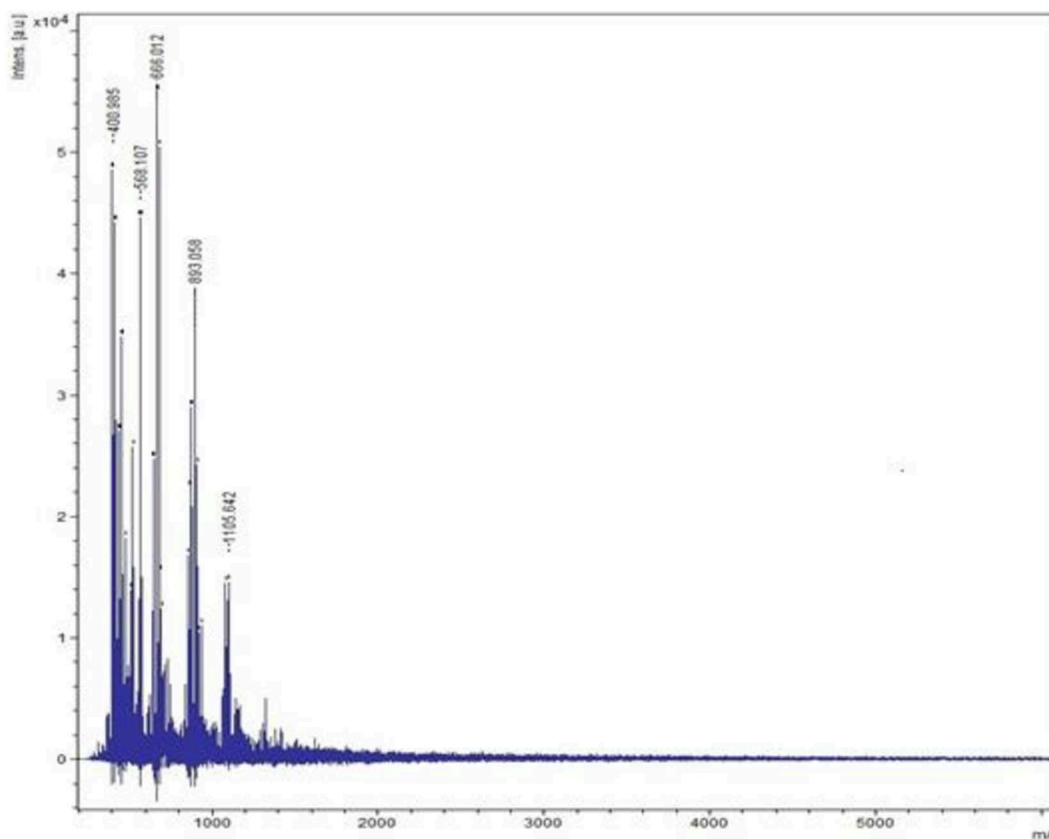


Columna: Beckman C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm x 260 mm. Tiempo de corrida: 20 min. Gradiente 5-50 % ACN. Detección UV a 280 nm.

En la Figura se aprecia una zona con varios picos principales, con  $t_r$  entre 2 y 7 min, comenzando a eluir con un porcentaje de ACN del 5 % y finalizando con 12 % de ACN. De esta fracción se puede decir que los compuestos peptídicos

son mayormente hidrofílicos y que no interaccionaron con la columna de C18, por eso eluyen a muy bajos porcentajes de ACN. Además se puede observar un pequeño pico con un tr de 13,4 min y que eluye con 32 % de ACN.

**Figura 31:** Espectro de Masas de MALDI-TOF de la fracción “sin retener” del extracto de *P. anomala* LTW6 hidrolizado con pepsina/quimotripsina



Se observa la presencia de 5 iones mayoritarios con los siguientes m/z: 871,060 Da; 877,082 Da; 893,058 Da; 909,030 Da y 1105,642 Da.

El espectro de Masas MALDI-TOF correspondiente a la fracción eluida al 2 % de ACN del extracto de *P. anomala* LTW6 hidrolizado con pepsina/quimotripsina permitió detectar la presencia de 5 iones mayoritarios con los siguientes m/z: 871,060 Da; 877,082 Da; 893,058 Da; 909,030 Da y 1105,642 Da (Figura 31).

### Análisis por Cromatografía de Alto Rendimiento de Intercambio Aniónico con Detección Amperométrica Pulsada

En la Tabla 19 se pueden apreciar los resultados obtenidos por cromatografía HPAEC-PAD, realizada para verificar la presencia de diferentes carbohidratos en las fracciones que resultaron activas frente a la enzima acetilcolinesterasa.

**Tabla 19:** Determinación de presencia/ausencia de carbohidratos

Extractos de levaduras	Enzimas proteolíticas	Carbohidratos		
		Manosa	Glucosa	Glucosamina
<i>Candida blankii</i> LTW7	tripsina	+++	++	+
	tripsina/quimotripsina	+++	++	+
	pepsina/quimotripsina	+++	++	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DBFIQ L2	proteínasa K	+++	++	+
	pepsina/quimotripsina	+++	++	-
<i>Pichia anomala</i> LTW6	pepsina/quimotripsina	+++	++	-

+++ Compuesto mayoritario; ++ Presencia; + Proporción muy minoritaria; - Ausencia

Aplicando esta metodología se determinó la presencia de manosa como compuesto mayoritario, como así también algo de glucosa, ambas presentes en todos los extractos analizados, y de una proporción muy minoritaria del azúcar glucosamina. Este último compuesto se detectó solamente en cuatro extractos manoproteínicos: los tres obtenidos a partir de la cepa de *C. blankii* LTW7 y el extracto de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizado con proteínasa K.

Diferentes autores obtuvieron resultados consistente con los aquí expuestos cuando determinaron el contenido de residuos de azúcares presente en las manoproteínas obtenidas luego de una extracción térmica. Manosa fue el carbohidrato que encontraron en mayor medida (Cameron y col., 1988;

Lukondeh y col., 2003; Gañan y col., 2009; Dikit y col., 2010 y glucosa en cantidad menor (Gañan y col., 2009). A diferencia de los resultados del presente trabajo, los otros investigadores no detectaron la presencia de glucosamina.

### SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD, EMPLEANDO CONCANAVALINA A, DE LAS FRACCIONES MÁS ACTIVAS FRENTE A ACHE Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA

Luego de efectuar los análisis cromatográfico y espectroscópico, las 6 fracciones manoproteínicas más activas frente a la enzima acetilcolinesterasa obtenidas por cromatografía en fase reversa fueron separadas nuevamente, en esta oportunidad por cromatografía de afinidad empleando Concanavalina A, obteniéndose dos nuevas fracciones: una fracción peptídica (FP) y una fracción glicopeptídica (FGP).

A cada una de estas fracciones se les volvió a determinar la actividad inhibitoria frente a AChE. Los resultados se pueden apreciar en la Tabla 20.

**Tabla 20:** Actividad inhibitoria frente a AChE de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad

Actividad Inhibitoria (%)				
Extractos de levaduras	Enzimas proteolíticas	Actividad fracción completa	Fracción peptídica	Fracción glicopeptídica
<i>C. blankii</i> LTW7	tripsina	64,0 ± 1,3	27,1 ± 1,4	66,6 ± 0,8
	tripsina/quimotripsina	46,0 ± 0,7	41,6 ± 0,9	49,3 ± 1,1
	pepsina/quimotripsina	64,0 ± 0,6	36,8 ± 1,5	77,8 ± 1,6
<i>S. cerevisiae</i> DBFIQ L2	proteínasa K	59,0 ± 0,8	26,2 ± 1,2	62,5 ± 1,0
	pepsina/quimotripsina	51,0 ± 0,6	46,7 ± 0,6	57,8 ± 0,7
<i>P. anomala</i> LTW6	pepsina/quimotripsina	59,0 ± 1,1	14,1 ± 0,4	63,3 ± 0,9

Los porcentajes de inhibición fueron calculados con un intervalo de confianza del 95 %. Control positivo: Galantamina 200 mmol l<sup>-1</sup>; actividad inhibitoria frente a AChE: 89,5 ± 0,7 %. Concentración de cada fracción: 5 mg ml<sup>-1</sup>.

Los resultados muestran que todas las fracciones, tanto las peptídicas como las glicopeptídicas, presentaron actividad inhibitoria frente a AChE. Se puede observar que las FGPs presentaron mayor inhibición frente a la enzima acetilcolinesterasa que las FPs, con valores de actividad comprendidos entre 49,3 y 77,8 %, siendo la FGP de *C. blankii* LTW7 hidrolizada con pepsina/quimotripsina la que presentó el mayor porcentaje de inhibición. En cambio, los valores de inhibición de las FPs estuvieron comprendidos entre 14,1 y 46,7 %, siendo la FP de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizada con pepsina/quimotripsina la que presentó mayor actividad anti-AChE. Asimismo, comparando con la fracción completa correspondiente, todas las FGPs presentaron mayores valores de inhibición, mientras que las FPs mostraron menores porcentajes de actividad anti-acetilcolinesterasa. Por ende, estos resultados nos permiten concluir que los glicopéptidos presentes en cada una de las fracciones obtenidas son los que ejercen acción frente a la enzima acetilcolinesterasa en mayor proporción y con valores altos de inhibición.

Sin embargo, dos de las fracciones peptídicas obtenidas, las de *C. blankii* LTW7 hidrolizada con tripsina/quimotripsina y la de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizada con pepsina/quimotripsina, presentaron también buenos resultados de actividad, con valores de inhibición de 41,6 y 46,7 %, respectivamente. Estos resultados indican que ciertos péptidos originados por hidrólisis de los diferentes extractos de manoproteínas también pueden inhibir a AChE en buena medida y deben ser tenidos en cuenta como potenciales agentes anti-AChE.

### **ANÁLISIS PEPTIDÓMICO POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LAS FRACCIONES PEPTÍDICAS ACTIVAS FRENTE A LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA**

---

Las 6 fracciones peptídicas obtenidas por cromatografía de afinidad que resultaron activas frente a AChE fueron analizadas empleando un cromatógrafo líquido nanoAcquity (Waters) acoplado a un Espectrofotómetro de Masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Los resultados obtenidos se observan en las Tablas 21 a 26.

**Tabla 21:** Secuencias obtenidas de la fracción peptídica de *C. blankii* LTW7 hidrolizada con tripsina

Secuencia**	Nr	Carga*	MH+ [Da]	T <sub>r</sub> [min]	Predicción estructura secundaria (PSIPREP)	% de H
<b>GGEEEDGVNNEHVEK</b>	14	-3	1512,66	15,78	Coil	14,29
<b>SSNDEDESSSSIPK</b>	13	-2	1352,58	16,61	Coil	15,38
<b>SNDEDESSSSIPK</b>	12	-2	1265,55	16,62	Coil	16,67
<b>YCEFACSST</b>	9	-1	1010,36	16,97	-	55,56
<b>SGGGGGGGLGSGGSIR</b>	16	+1	1232,60	17,47	Coil	12,50
<b>ATAGDTHLGGEDFDNR</b>	16	-2	1675,73	18,53	Coil	25,00
<b>GNVGDEGGVAPDIK</b>	14	-2	1327,65	18,79	Coil	35,71
<b>VGDEGGVAPDIK</b>	12	-2	1156,59	18,84	Coil	41,67
<b>GQSAGNVGDEGGVAPDIK</b>	18	-2	1670,80	18,95	Coil	33,33
<b>SAGNVGDEGGVAPDIK</b>	16	-2	1485,72	19,00	Coil	37,50
<b>VPDGELGDKIQ</b>	11	-2	1170,60	19,04	Coil	36,36
<b>SEGDTLIIDGHK</b>	12	-1	1284,65	19,14	Hoja β (T <sub>5</sub> -I <sub>8</sub> )	25,00
<b>YGQSAGNVGDEGGVAPDIK</b>	19	-2	1833,86	19,50	Coil	36,84
<b>GELEDQFIDR</b>	10	-3	1221,58	20,29	Hélice α (E <sub>2</sub> -I <sub>8</sub> )	30,00
<b>VDGAADDIFEK</b>	11	-3	1179,55	20,60	Hélice α (A <sub>4</sub> -E <sub>10</sub> )	45,45
<b>SEGDTLIIDGH</b>	11	-2	1156,55	20,77	Hoja β (T <sub>5</sub> -I <sub>8</sub> )	27,27
<b>SIGDSLFDDEGAK</b>	13	-3	1353,62	21,89	Coil	30,77
<b>VAPEEHPVLLTEAPLNPK</b>	18	-1	1954,06	21,92	Hoja β (V <sub>8</sub> -E <sub>12</sub> )	61,11

\*\* Determinada por LC-MS-MS. T<sub>r</sub>: tiempo de retención. Nr: número de residuos.

\*Carga neta a pH: 7. Los péptidos de mayor tamaño fueron analizados con el método predictivo PSIPREP (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). % de H: % de aminoácidos hidrofóbicos, calculado con el programa Heliquest (<http://heliquest.impc.cnrs.fr/>).

Para la FP de *C. blankii* LTW7 hidrolizada con tripsina se obtuvieron 18 secuencias peptídicas. Se pueden ver en dicha Tabla cinco secuencias que comparten la región aminoacídica de 12 residuos que se detalla a continuación: **VGDEGGVAPDIK**

Y G Q S A G N V G D E G G V A P D I K  
G Q S A G N V G D E G G V A P D I K  
S A G N V G D E G G V A P D I K  
G N V G D E G G V A P D I K  
V G D E G G V A P D I K

---

También existen otras dos secuencias que presentan una región aminoacídica en común:

S S N D E D S S S S I P K  
S N D E D S S S S I P K

---

Se observa un predominio de secuencias aniónicas, de carácter ácido, conteniendo entre 9 y 19 residuos aminoacídicos. Solamente una de las 18 secuencias obtenidas fue catiónica (carga neta +1) y con carácter básico, siendo la misma la secuencia **SGGGGGGLGSGGSIR**, rica en el aminoácido glicina. Poseen porcentajes de aminoácidos hidrofóbicos que van desde 12,50 % a 61,11 %, calculado en base al total de aminoácidos en cada secuencia.

Asimismo, dos secuencias presentan tendencia a la formación de estructuras Hélices  $\alpha$  y tres a la formación de estructuras Hoja  $\beta$ .



**Tabla 22:** Secuencias obtenidas de la fracción peptídica de *C. blankii* LTW7 hidrolizada con tripsina/quimotripsina

Secuencia**	Nr	Carga*	MH+ [Da]	T <sub>r</sub> [min]	Predicción estructura secundaria (PSIPREP)	% de H
<b>GDEGGVAPDIK</b>	11	-2	1057,51	17,67	Coil	36,36
<b>GQSAGNVGDEGGVAPDIK</b>	18	-2	1670,80	18,36	Coil	33,33
<b>YQSAGNVGDEGGVAPDIK</b>	19	-2	1833,86	18,92	Coil	36,84
<b>GFSIGISDVTPSESLE</b>	16	-3	1637,79	27,57	Hoja β (F <sub>2</sub> -I <sub>4</sub> ; I <sub>6</sub> -D <sub>8</sub> )	37,50
<b>TCSIMKKGKISQGEQI</b>	15	+1	1638,81	27,79	Coil	33,33
<b>FINSNSSNLTDVSKL</b>	15	0	1638,82	30,79	Hoja β (T <sub>10</sub> -D <sub>11</sub> )	33,33
<b>ADSIDDEEAKDVVNRSYANA</b>	20	-4	2181,98	45,44	Hélice α (D <sub>6</sub> -A <sub>18</sub> )	40,00

\*\*Determinada por LC-MS-MS. T<sub>r</sub>: tiempo de retención. Nr: número de residuos.

\*Carga neta a pH: 7. Los péptidos de mayor tamaño fueron analizados con el método predictivo PSIPREP (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). % de H: % de aminoácidos hidrofóbicos, calculado con el programa Heliquest (<http://heliquest.impc.cnrs.fr/>).

Se pueden observar las secuencias obtenidas para la FP de *C. blankii* LTW7 hidrolizada con tripsina/quimotripsina. Se obtuvieron 7 secuencias peptídicas, principalmente aniónicas, con una carga neta variable entre -2 y -4. Estas secuencias contienen entre 11 y 20 aminoácidos y poseen porcentajes de aminoácidos hidrofóbicos que van desde 33,33 % a 40,00 %. Se observan 3 secuencias con una región aminoacídica en común: **GDEGGVAPDIK**

Y G Q S A G N V G D E G G V A P D I K  
G Q S A G N V G D E G G V A P D I K  
G D E G G V A P D I K

Dos de tales secuencias también se encuentran en la FP de *C. blankii* LTW7 hidrolizada con tripsina. La región **GDEGGVAPDIK** forma parte o está contenida tanto en las 2 secuencias presentes en ambas fracciones como en el

resto de las secuencias comunes obtenidas en la fracción de *C. blankii* LTW7 hidrolizada con tripsina.

Además, dos secuencias presentan tendencia a la formación de Hojas  $\beta$  y solamente una a la formación de Hélices  $\alpha$ .

**Tabla 23:** Secuencias obtenidas de la fracción peptídica de *C. blankii* LTW7 hidrolizada con pepsina/quimotripsina

Secuencia**	Nr	Carga*	MH+ [Da]	T <sub>r</sub> [min]	Predicción estructura secundaria (PSIPREP)	% de H
<b>YGERDEESDSDEYEDEDDE DSDDEHPF</b>	27	-15	3268,12	12,65	Coil	14,81
<b>EEMVDIEDDDEEVTMVYD</b>	18	-10	2191,84	15,38	Hoja $\beta$ (M <sub>3</sub> -D <sub>5</sub> ; E <sub>12</sub> -Y <sub>17</sub> )	38,89
<b>RERKGYWYVE</b>	10	+1	1385,69	16,40	Hoja $\beta$ (Y <sub>6</sub> -V <sub>9</sub> )	40,00
<b>VTSFTNYITPDVSSSSGSMIN TNQ</b>	24	-1	2550,17	26,21	Hoja $\beta$ (S <sub>3</sub> -F <sub>4</sub> ; Y <sub>7</sub> -I <sub>8</sub> ; I <sub>20</sub> -N <sub>21</sub> )	33,33
<b>AECIKVIRKGSRKSPAMGDR IVCVIQKAKPLTQNITG</b>	38	+6	4124,30	29,49	Hoja $\beta$ (C <sub>3</sub> -I <sub>7</sub> ; R <sub>21</sub> -Q <sub>27</sub> )	47,95

\*\*Determinada por LC-MS-MS. T<sub>r</sub>: tiempo de retención. Nr: número de residuos.

\*Carga neta a pH: 7. Los péptidos de mayor tamaño fueron analizados con el método predictivo PSIPREP (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). % de H: % de aminoácidos hidrofóbicos, calculado con el programa Heliquist (<http://heliquist.impc.cnrs.fr/>).

Cinco secuencias peptídicas se encontraron para la FP de *C. blankii* LTW7 hidrolizada con pepsina/quimotripsina. En la Tabla 23 se observa que 3 de las secuencias son aniónicas y de carácter ácido y el resto son catiónicas con carácter básico. El número de residuos de aminoácidos de las secuencias varió entre 10 y 38 y el contenido de aminoácidos hidrofóbicos varió entre 14,81 % y 47,95 %.

Además, cuatro de las secuencias encontradas presentaron tendencia a la formación de estructuras  $\beta$ .

**Tabla 24:** Secuencias obtenidas de la fracción peptídica de *S. cerevisiae* LBFIQ L2 hidrolizada con proteinasa K

Secuencia**	Nr	Carga*	MH+ [Da]	T <sub>r</sub> [min]	Predicción estructura secundaria (PSIPREP)	% de H
<b>KDIPVPKPK</b>	9	+2	1021,64	16,39	-	55,56
<b>GNVGDEGGVAPN</b>	12	-2	1085,49	16,87	Coil	33,33
<b>AIVDDQDEVK</b>	10	-3	1131,55	17,21	Hélice $\alpha$ (D <sub>7</sub> -V <sub>9</sub> )	40,00
<b>FDGPPPQ</b>	7	-1	757,35	17,59	-	57,14
<b>IDAIEQPSRPT</b>	11	-1	1226,64	17,74	Coil	45,45
<b>LPDYPGVDADNIK</b>	13	-2	1416,70	20,56	Coil	53,85
<b>LEPGVVRYYLDPF</b>	13	-1	1567,81	21,10	Hoja $\beta$ (V <sub>5</sub> -L <sub>10</sub> )	69,23

\*\*Determinada por LC-MS-MS. T<sub>r</sub>: tiempo de retención. Nr: número de residuos.

\*Carga neta a pH: 7. Los péptidos de mayor tamaño fueron analizados con el método predictivo PSIPREP (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). % de H: % de aminoácidos hidrofóbicos, calculado con el programa Heliquest (<http://heliquest.impc.cnrs.fr/>).

Para la FP de *S. cerevisiae* LBFIQ L2 hidrolizada con proteinasa K se encontraron 7 secuencias peptídicas como se observa en la Tabla 24. Dichas secuencias contienen entre 7 y 13 residuos aminoacídicos, siendo las mismas principalmente aniónicas, a excepción de la secuencia **KDIPVPKPK**, que presenta una carga neta de +2 y por ende posee carácter básico. Contienen un porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos comprendido entre el 33,33 % y el 69,23 %.

Dos secuencias presentaron tendencias a la formación de estructuras secundarias, una a Hoja  $\beta$  y otra a Hélice  $\alpha$ .

**Tabla 25:** Secuencias obtenidas de la fracción peptídica de *S. cerevisiae* LBFIQ L2 hidrolizada con pepsina/quimotripsina

Secuencia**	Nr	Carga*	MH+ [Da]	T <sub>r</sub> [min]	Predicción estructura secundaria (PSIPREP)	% de H
<b>TNANTPDRLQQ</b>	11	0	1257,62	16,66	Hélice $\alpha$ (D <sub>7</sub> -Q <sub>10</sub> )	27,27
<b>LKQSETQDLKV</b>	11	0	1288,71	17,72	Hélice $\alpha$ (E <sub>5</sub> -D <sub>8</sub> )	27,27
<b>VEKSKPTYPGTEF</b>	13	0	1482,74	18,70	Coil	38,46
<b>VVVEPVSGSGTIN</b>	13	-1	1257,67	19,99	Hoja $\beta$ (V <sub>2</sub> -P <sub>5</sub> )	46,15
<b>SLSESTKGQVTF</b>	12	0	1283,65	20,07	Hoja $\beta$ (Q <sub>9</sub> -T <sub>11</sub> )	25,00
<b>LADEEDAIHDEL</b>	12	-5	1369,61	20,66	Hélice $\alpha$ (E <sub>4</sub> -E <sub>11</sub> )	41,67
<b>IVDDQDEVKW</b>	10	-3	1246,59	20,82	Hélice $\alpha$ (Q <sub>5</sub> -V <sub>8</sub> )	40,00
<b>AELADEEDAIHDEL</b>	14	-6	1569,69	21,06	Hélice $\alpha$ (E <sub>8</sub> -E <sub>13</sub> )	42,86
<b>KLSTAASFSQTVSAV</b>	15	+1	1496,79	21,26	Hélice $\alpha$ (L <sub>2</sub> -S <sub>13</sub> )	46,67
<b>SIVSNDELSKAAF</b>	13	-1	1380,70	21,71	Hélice $\alpha$ (N <sub>5</sub> -A <sub>12</sub> )	46,15
<b>QVSLQDKTGF</b>	10	0	1122,58	33,34	Hoja $\beta$ (S <sub>3</sub> -L <sub>4</sub> )	30,00
<b>MSQSSHHEMTPVDTGNSDR</b> <b>KRRRVTRACDVCR</b>	32	+6	3747,77	35,20	Hélice $\alpha$ (S <sub>13</sub> -V <sub>30</sub> )	28,12

\*\*Determinada por LC-MS-MS. T<sub>r</sub>: tiempo de retención. Nr: número de residuos.

\*Carga neta a pH: 7. Los péptidos de mayor tamaño fueron analizados con el método predictivo PSIPREP (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). % de H: % de aminoácidos hidrofóbicos, calculado con el programa Heliquist (<http://heliquist.impc.cnrs.fr/>).

En la Tabla 25 se observan las secuencias (12 en total) cuya presencia se ha determinado en la FP de *S. cerevisiae* LBFIQ L2 hidrolizada con pepsina/quimotripsina. En este caso 7 de las secuencias son catiónicas o presentan carga neta 0, con carácter básico o neutro respectivamente. El contenido de residuos aminoácidos varió entre 10 y 15. El contenido de aminoácidos hidrofóbicos varió entre 25,00 % y 47,15 %.

Se observa también la presencia de dos secuencias que contienen una región aminoacídica en común:

A E L A D E E D A I H D E L  
L A D E E D A I H D E L

Además, once de las doce secuencias obtenidas presentaron tendencias a la formación de estructuras secundarias. Ocho poseen tendencias a la formación de Hélices  $\alpha$  y tres a Hojas  $\beta$ .

**Tabla 26:** Secuencias obtenidas de la fracción peptídica de *P. anomala* LTW6 hidrolizada con pepsina/quimotripsina

Secuencia**	Nr	Carga*	MH+ [Da]	T <sub>r</sub> [min]	Predicción estructura secundaria (PSIPREP)	% de H
<b>DENGEEIVHTGPGRPRKNAA</b> <b>AAATTSTSTTSAATAASKVK</b> <b>KTTP</b>	44	+3	4381,27	36,49	Hoja $\beta$ (E <sub>6</sub> -H <sub>9</sub> ); Hélice $\alpha$ (N <sub>18</sub> - T <sub>24</sub> ; T <sub>30</sub> -K <sub>41</sub> )	34,09
<b>EISSSSEVSSEIPSSSEVSSS</b> <b>SENSSSSEISSSSEITTSSEV</b> <b>DNPY</b>	47	-9	4792,08	34,39	Hoja $\beta$ (V <sub>8</sub> -S <sub>9</sub> ; I <sub>37</sub> -T <sub>39</sub> )	21,28

\*\*Determinada por LC-MS-MS. T<sub>r</sub>: tiempo de retención. Nr: número de residuos.

\*Carga neta a pH: 7. Los péptidos de mayor tamaño fueron analizados con el método predictivo PSIPREP (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). % de H: % de aminoácidos hidrofóbicos, calculado con el programa Heliquist (<http://heliquist.impc.cnrs.fr/>).

En lo que respecta a la FP de *P. anomala* LTW6 hidrolizada con pepsina/quimotripsina, el análisis peptidómico determinó la presencia de 2 secuencias que contenían 44 y 47 residuos aminoacídicos siendo la primera catiónica y básica y la segunda aniónica (ver Tabla 26). El porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos fue de 34,09 % y de 21,28 %, respectivamente. Asimismo, la predicción de la tendencia a la formación de estructuras secundarias determinó que una de las secuencias posee tendencia a la formación tanto de Hélice  $\alpha$  como de Hoja  $\beta$ , y la otra secuencia sólo de estructuras  $\beta$ .

Hasta el presente se han llevado a cabo numerosos estudios en gran parte del mundo para generar péptidos bioactivos por hidrólisis de proteínas alimentarias. Como resultado de los mismos, varios hidrolizados enzimáticos son actualmente aplicados para mejorar y potenciar las propiedades nutricionales y funcionales de las proteínas. Además, el uso de diferentes enzimas con distintos mecanismos de hidrólisis permite obtener péptidos con diferentes propiedades bioactivas (Ahn y col., 2010). Se han aislado y caracterizado péptidos bioactivos a partir de distintas fuentes de proteínas alimentarias, incluyendo leche y productos lácteos, huevo, pescado, ostras, cereales (arroz, trigo, cebada, maíz), soja, semillas de rábano, entre otros. Dentro de las funciones bioactivas que se han identificado se pueden mencionar propiedades antihipertensivas (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina), antioxidantes, anticancerígenas, inmunomoduladoras y antagonistas y agonistas opiodes (Wang y de Mejía, 2005).

Sin embargo cabe destacar que no se han encontrado en la literatura consultada investigaciones previas sobre actividad anti acetilcolinesterasa debida a péptidos o glicopéptidos derivados de manoproteínas de levaduras. Además, también es destacable el hecho de que se han encontrado muy pocos reportes de hidrolizados proteicos o de péptidos aislados de diferentes fuentes naturales que presenten actividad inhibitoria frente a dicha enzima. Asimismo, el estudio estructural de estos hidrolizados o péptidos bioactivos es mínimo o todavía no se ha realizado.

Por ende, la comparación de la actividad inhibitoria contra AChE de las diferentes fracciones peptídicas o glicopeptídicas de los hidrolizados de manoproteínas obtenidos en este estudio es difícil, debido a la muy escasa información presente en la literatura.

Uno de tales péptidos con actividad anti AChE que ha sido encontrado y caracterizado es el péptido catiónico Snakin-Z, aislado de frutos de *Zizyphus jujuba*, una planta medicinal (Zare-Zardini y col., 2013). Este péptido posee una masa molecular de 3318,82 Da y la siguiente secuencia: CARLNCVPGKGTSGNTEPCYASLHSCRKYG. Es un péptido de carácter básico y con carga neta de +4.

En otro estudio realizado por Rafiquzzaman y col. (2015), los autores determinaron que una glicoproteína aislada de *Undaria pinnatifida*, una

macroalga, posee actividad inhibitoria frente a AChE. Dicha glicoproteína tiene un peso molecular aproximado de 10 kDa. Además, Tsai y col. (2015) aislaron dos complejos péptido-polisacárido denominados CPSP-F1 y CPSP-F2, que exhibieron buena actividad anti AChE. Los mismos fueron obtenidos a partir del hongo *Cordyceps militaris*. Ambos complejos péptido-polisacárido están compuestos principalmente de los azúcares manosa, galactosa y arabinosa. Los polímeros están compuestos por aminoácidos acídicos y no polares, tales como ácido glutámico y prolina. Además, los aminoácidos alanina, glicina y leucina se detectaron en mayor medida en CPSP-F1, mientras que lisina y metionina lo fueron en CPSP-F2.

Otros dos péptidos que presentan actividad anti AChE son Fasciculina 1 y Fasciculina 2, aisladas del veneno de la serpiente mamba verde, *Dendroaspis angusticeps*. Ambas Fasciculinas tienen 61 residuos de aminoácidos, 4 puentes disulfuros y poseen una carga neta de +4. El peso molecular es de 6765 Da para Fasciculina 1 (Secuencia: TMCYSHTTTSRAILTNCGENSCYRKSRRHPPKMVLGRGCGCPPGDDYLEVKCCTS PDKCNY) y 6735 Da para Fasciculina 2 (Secuencia: TMCYSHTTTSRAILTNCGENSCYRKSRRHPPKMVLGRGCGCPPGDDNLEVKCCTS PDKCNY) (Karlsson y col., 1984; Kafurke y col., 2015).

El análisis cromatográfico y espectrométrico de las 6 fracciones de los hidrolizados de manoproteínas más activos frente a AChE investigados en el presente trabajo, permitió observar la presencia de péptidos o glicopéptidos que poseen pesos moleculares que varían desde los 700 y los 4800 Da, principalmente hidrofílicos, que fueron muy poco retenidos por la columna de C18 o de hidrofobicidad media. También se pudo determinar la presencia de tres residuos de azúcares: manosa, glucosa y glucosamina. La actividad anti-acetilcolinesterasa estuvo centrada en la fracciones glicopeptídicas principalmente, aunque dos de las seis fracciones peptídicas presentaron buena actividad inhibitoria frente a AChE. El análisis por ESI-MS-MS permitió obtener diversas secuencias, pero sólo se han podido analizar péptidos sin glicosilar. Dichas secuencias no presentaron regiones aminoacídicas en común con las secuencias detectadas para los péptidos descriptos en la bibliografía.

Por lo tanto y ha nuestro conocimiento, éste sería uno de los primeros trabajos científicos dedicados a este tema específico, y podría ser una contribución

original a esta área del conocimiento, con potencial uso en el campo del diseño de nuevos alimentos funcionales como así también en el de la obtención de nuevos agentes terapéuticos.



## CONCLUSIONES PARCIALES

---

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos del estudio y evaluación “*in vitro*” de la actividad inhibitoria frente a AChE y ECA, así como de la actividad antimicrobiana de péptidos y glicopéptidos derivados de manoproteínas, obtenidos por hidrólisis con enzimas comerciales, de cepas de levaduras aisladas de productos alimentarios de las regiones santafesina y patagónica. Además, se muestran también los resultados concernientes a la caracterización e identificación de los compuestos activos de cada fracción, realizadas por métodos cromatográficos y espectroscópicos.

En función de esos resultados previamente expuestos, se pueden formular las siguientes conclusiones parciales:

- El método empleado para la obtención de manoproteínas, la extracción térmica, resultó adecuado para obtener diferentes extractos a partir de todas las cepas ensayadas, aunque, en general, los rendimientos fueron menores que los reportados en bibliografía. Por ende, fue necesario realizar varias extracciones para obtener suficiente cantidad de muestra para poder llevar a cabo los ensayos posteriores.
- La purificación por cromatografía de afinidad, empleando Concanavalina A, de las manoproteínas presentes en cada extracto, así como su posterior diálisis, resultaron apropiadas, pudiendo separar tales manoproteínas del resto de proteínas y de las impurezas presentes en el crudo. La lectina Con A resultó óptima para separar manoproteínas gracias a su afinidad por el residuo  $\alpha$ -D-manosa, principal azúcar presente en dichas glicoproteínas.
- El análisis por SDS-PAGE, tanto de los diferentes crudos obtenidos por extracción térmica como de los extractos de manoproteínas, permitió confirmar la purificación luego del tratamiento con Concanavalina A. Esto se puede afirmar debido a la presencia de varias bandas que corresponden a diferentes manoproteínas o fracciones de las mismas. Este mismo análisis demostró que los compuestos purificados poseen un peso molecular comprendido entre 6,5 y 30 kDa.
- La hidrólisis enzimática se aplica frecuentemente para mejorar las propiedades funcionales y nutricionales de las proteínas. Por ello es que se

han utilizado distintas enzimas con diferentes mecanismos de hidrólisis, con el fin de producir diversos péptidos con diferentes secuencias primarias, debido a que la bioactividad de los péptidos es dependiente de dicha secuencia primaria. La digestión enzimática de los extractos de manoproteínas con las enzimas tripsina, pepsina, proteinasa K y quimotripsina se confirmó tanto por SDS-PAGE como por la determinación del grado de hidrólisis. Ambas metodologías evidenciaron la potencial formación de péptidos o glicopéptidos luego de la proteólisis enzimática. Además, se pudo inferir que tales péptidos producidos tendrían un PM menor a 6,5 kDa.

- El screening para determinar la actividad inhibitoria frente a la enzima convertidora de angiotensina permitió afirmar que todos los extractos de manoproteínas hidrolizados presentaron baja o nula actividad en todas las concentraciones ensayadas. El valor máximo de actividad inhibitoria correspondió al extracto de la cepa *S. cerevisiae* LBFIQ L2 hidrolizada con pepsina/quimotripsina a una concentración de 5 mg ml<sup>-1</sup>. Estos resultados permiten inferir que los péptidos o glicopéptidos presentes en cada uno de los extractos no son buenos inhibidores de la actividad de ECA.

- Al evaluar la capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias Gram (+) y Gram (-) causantes de ETAs, se obtuvieron resultados positivos frente a las cepas de *Listeria monocytogenes* tipo I DTUNLu 328 y de *Bacillus cereus* DBFIQ B 28. Lo contrario ocurrió frente a las cepas de *Escherichia coli* DBFIQ Ec 9 y de *Staphylococcus aureus* DBFIQ S 21. Los resultados obtenidos frente a *L. monocytogenes* tipo I demostraron que los extractos doblemente hidrolizados presentaron una actividad inhibitoria mucho mayor que los hidrolizados de forma simple. Frente a la cepa de *B. cereus* DBFIQ B 28, todos los extractos hidrolizados obtenidos por la acción única de tripsina y todos los doblemente hidrolizados presentaron actividad inhibitoria del crecimiento. El estudio de las cinéticas de crecimiento demostró que el efecto antibacteriano sólo puede ser considerado como bacteriostático y no como bactericida.

- El screening de la actividad inhibitoria frente a la enzima acetilcolinesterasa de los extractos de manoproteínas hidrolizados mostró resultados variables. Entre ellos merecen destacarse los siguientes:

- De los 5 extractos hidrolizados únicamente con tripsina, el de *C. blankii* LTW7 es el que inhibió en mayor medida a AChE, siendo éste también el más activo entre los doblemente hidrolizados con tripsina/quimotripsina.

- De los extractos hidrolizados únicamente con la enzima pepsina, sólo el de la cepa de *B. intermedius* DBFIQ L12 presentó considerable actividad. En general, los doblemente hidrolizados con pepsina /quimotripsina presentaron mayor inhibición frente a AChE, siendo los más activos los de *P. anomala* LTW6, *C. blankii* LTW7 y *S. cerevisiae* DBFIQ L2.

- En lo que concierne a los extractos hidrolizados con la enzima proteinasa K, los valores importantes de inhibición se obtuvieron con los de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 y de *C. famata* DBFIQ L17. Los extractos doblemente hidrolizados con proteinasa K/quimotripsina no presentaron actividad inhibitoria considerable.

- Los 6 extractos de mayor actividad inhibitoria frente a AChE presentaron valores de Concentración Inhibitoria 50 (CI50) que variaron entre 6,8 y 14,4 mg ml<sup>-1</sup>, siendo el de *S. cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizado con pepsina/quimotripsina el que presentó el menor valor de CI50.

- El fraccionamiento por cromatografía en fase reversa empleando los cartuchos Sep Pack de C18 permitió la obtención de 6 fracciones con actividad considerable. Los valores de inhibición para las fracciones más activas estuvieron comprendidos entre 46 y 64 %, siendo los más activos los extractos de manoproteínas de *C. blankii* LTW7 hidrolizados tanto con tripsina como con pepsina/quimotripsina.

- Dicho fraccionamiento permitió obtener un aumento de la actividad inhibitoria frente a la enzima acetilcolinesterasa de todas las fracciones, al compararla con la de los extractos hidrolizados de manoproteínas completos. De este modo se pudo avanzar en el proceso de purificación de la/s sustancia/s más activa/s, dado que se obtuvieron fracciones peptídicas más puras.

- Asimismo, dichas fracciones fueron analizadas por HPLC, Espectrometría de Masas MALDI-TOF y se determinó la presencia/ausencia y el tipo de azúcares presentes por cromatografía HPAEC-PAD. Se pudo comprobar la existencia de péptidos principalmente hidrofílicos, cuyo peso molecular estuvo comprendido entre 700 y 4800 Da. Además, se determinó la presencia de azúcares en todas

las fracciones, siendo manosa el azúcar presente en mayor cantidad. Estos resultados sugieren la potencial presencia de glicopéptidos en las fracciones activas frente a AChE, hecho que fue confirmado por la metodología empleada a posteriori.

- El fraccionamiento por cromatografía de afinidad empleando concanavalina A de las 6 fracciones más activas permitió obtener dos nuevas fracciones desde cada una de ellas: una peptídica (FP) y otra glicopeptídica (FGP). Las fracciones glicopeptídicas presentaron la mayor actividad anti-acetilcolinesterasa, con valores comprendidos entre 49,3 y 77,8 %. Además, en todos los casos la actividad de las FGPs fue mayor que las fracciones completas. De este modo se pudo avanzar en el proceso de purificación de la/s sustancia/s más activa/s, dado que se obtuvieron fracciones glicopeptídicas más puras.

- Aunque la actividad de las fracciones peptídicas fue menor en todos los casos ya sea comparado con las fracciones completas o con las FGPs, dos de tales fracciones presentaron buenos valores de actividad anti-acetilcolinesterasa con valores ligeramente superiores al 40 %.

- En relación al análisis peptidómico realizado sobre las 6 FPs por ESI-MS-MS, resulta evidente que la información obtenida es muy amplia y difícil de analizar, sobre todo si se tiene en cuenta la ausencia de datos bibliográficos a la que ya se ha aludido previamente. La aplicación de este método requiere de un análisis posterior para constatar cuáles secuencias son las que presentan actividad inhibitoria frente a AChE, teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas y estructurales de cada una de ellas. De las secuencias obtenidas sólo se puede concluir que la mayor parte de ellas son péptidos de longitud medianamente corta, aniónicos y de carácter ácido. Además, se pudo predecir la tendencia a la formación de estructuras secundarias, observándose la predicción de estructuras Hélices  $\alpha$  y Hojas  $\beta$ .

## **CAPÍTULO II:**

Proteólisis microbiana  
sobre compuestos  
caseínicos para  
generar péptidos  
bioactivos



**RESULTADOS**  
**Y**  
**DISCUSIÓN**

## **OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS (HP) A PARTIR DE CULTIVOS DE CEPAS DE LEVADURAS Y DE BAL EN CASEÍNA Y EN EL SUSTRATO COMERCIAL NZ-CASE PLUS**

---

Se utilizaron 5 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus*, y 11 cepas de levaduras pertenecientes a los géneros *Candida*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus* y *Dipodascus*, según lo detallado en la Sección Materiales y Métodos.

Como proteínas a ser hidrolizadas por los microorganismos en ensayo se emplearon caseína (Merck) y un sustrato comercial NZ-Case Plus (Sigma).

Luego del proceso de cultivo de las cepas de levaduras y de BAL, los hidrolizados proteicos libres de células se obtuvieron por centrifugación y filtración.

En la Tabla 27 se muestra la concentración proteica y el pH final de cada uno de los HP obtenidos.

Se puede apreciar en ella que los valores de concentración proteica y de pH final determinados en los HP fueron sumamente variables y estuvieron comprendidos entre 3,1 y 9,7 mg ml<sup>-1</sup>, y entre 3,5 y 9,2; respectivamente.

En lo que respecta a la concentración de proteínas en los HP de BAL, cuyos valores estuvieron comprendidos entre 5,9 y 9,7 mg ml<sup>-1</sup>, se observa que todas las cepas de BAL utilizaron como fuente nitrogenada para su nutrición las proteínas de ambas soluciones, y en mayor medida las presentes en la solución de caseína. Se aprecia también que 3 de las 5 cepas ensayadas mostraron valores sensiblemente mayores de utilización de caseína, mientras que para las otras 2 los valores resultaron coincidentes para las dos fuentes proteicas. De esto se podría inferir que la capacidad de metabolización de las 3 cepas mencionadas es mayor frente a caseína que frente a las proteínas presentes en el hidrolizado NZ-Case Plus, mientras que las otras 2 cepas mostraron una capacidad similar en presencia de ambas fuentes de proteínas.

En los HP de levaduras los valores de concentración de proteínas estuvieron comprendidos entre 3,1 y 9,3 mg ml<sup>-1</sup>, lo que indica que, en general, las cepas de levaduras presentaron una capacidad de utilización como fuente nitrogenada de las proteínas ensayadas algo superior a la de las BAL. Se observa además que 6 de las 8 cepas pertenecientes al género *Candida*, y en

especial la cepa *C. krusei* 1, dejaron, como las BAL, un menor remanente de proteínas al actuar sobre caseína, mientras que las cepas pertenecientes a otros géneros presentaron mayor actividad metabólica frente al hidrolizado NZ-Case Plus. Como en el caso anterior, los valores obtenidos estarían indicando que las levaduras estudiadas poseen una capacidad de metabolización mayor que las cepas de BAL, y que esta mayor capacidad frente a una u otra de las soluciones proteicas ensayadas depende de cada especie y cepa en particular.

En lo que respecta a los valores de pH final determinado en todos los HP, se observa que fueron sumamente variables y estuvieron comprendidos entre 3,5 y 9,2.

Luego de 48 horas de cultivo, el pH descendió en todos los sobrenadantes obtenidos a partir de los cultivos de las distintas cepas de BAL, mostrando valores que estuvieron comprendidos entre 5,3 y 3,5. También se observa que los descensos de pH fueron considerablemente mayores cuando las cepas se propagaron teniendo caseína como fuente nitrogenada, lo que puede atribuirse a una población celular más numerosa o bien a un mayor efecto tamponante del hidrolizado NZ-Case Plus. Dicha disminución del pH era predecible, ya que se debe principalmente a la liberación de ácidos orgánicos, en mayor medida de ácido láctico, durante la propagación celular.

Este descenso de pH es coincidente con lo obtenido en estudios similares realizados por otros investigadores. Pihlanto-Leppälä y col. (1998) obtuvieron cultivos de BAL con valores de pH que disminuyeron desde 6,3 a 4,0. Ramchandran y Shaw (2008) también encontraron un descenso del pH luego de seis horas de cultivo de diferentes cepas de BAL, desde un valor inicial de 6,2 hasta valores que llegaron a 5,1. Chaves-López y col. (2014) observaron una disminución del pH en cultivos de diferentes BAL, desde un valor de 6,6 a 4,1; luego de 36 horas.

Por otro lado, en los HP obtenidos con levaduras, el pH disminuyó o aumentó dependiendo de la cepa utilizada, con valores comprendidos entre 4,0 y 9,2. Se puede ver también que dentro del mismo género de levaduras, algunas cepas acidificaron y otras alcalinizaron el medio de propagación. Estos resultados muestran que existen diferencias metabólicas inter e intra géneros de levaduras. Asimismo, se aprecia que, para todas las cepas ensayadas, el pH final siempre resultó menor cuando desarrollaron en presencia de caseína.



**Tabla 27:** Concentración proteica y pH final de los diferentes hidrolizados proteicos (HP) obtenidos con caseína y NZ-Case Plus al 1 %

Cepas utilizadas	HP con NZ-Case Plus		HP con caseína	
	Concentración proteica estimada (mg ml <sup>-1</sup> )	pH	Concentración proteica estimada (mg ml <sup>-1</sup> )	pH
<i>L. plantarum</i> DBFIQ LP31	9,4	4,8	6,3	3,8
<i>L. helveticus</i> DBFIQ LH303	8,4	4,8	8,2	3,8
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DBFIQ LB92	8,5	5,1	7,0	3,5
<i>Enterococcus faecium</i> ETW4	7,2	5,3	7,2	3,5
<i>Enterococcus faecalis</i> DBFIQ E24	9,7	5,2	5,9	3,7
<i>Candida krusei</i> 1	7,4	9,2	3,1	8,2
<i>Candida famata</i> 24	9,3	7,8	6,2	7,1
<i>Brettanomyces custersii</i> 13	3,4	8,4	5,3	7,6
<i>Cryptococcus albidus</i> 8	3,7	7,9	5,3	7,5
<i>Candida incomunis</i> LTW1	5,2	8,5	4,7	8,2
<i>Dipodascus macrosporus</i> LTW4	4,7	5,7	6,8	4,4
<i>Candida blankii</i> LTW7	5,7	5,5	4,6	4,6
<i>Candida blankii</i> LTW9	3,9	8,5	4,0	8,2
<i>Candida inconspicua</i> LTW11	6,0	8,7	5,6	8,3
<i>Candida bertae</i> LTW14	7,2	5,2	6,0	4,0
<i>Candida neoformans</i> LTW3	5,0	8,6	5,6	7,8

Concentración proteica solución de NZ-Case Plus: 10,3 mg ml<sup>-1</sup>. Concentración proteica solución de caseína: 10,9 mg ml<sup>-1</sup>.

Chaves-López y col. (2012) observaron una disminución del pH para cultivos en leche desnatada de diferentes cepas de levadura, tales como *Kluyveromyces marxianus* 26A, *Torulaspora delbrueckii* KL66, *Candida lusitaniae* KL4, *Pichia kudriavzevii* KL52, *Pichia kudriavzevii* KL84A, *Galactomyces geotrichum* KL20A. En este estudio los valores de pH disminuyeron desde 6,3 a valores cercanos a 5,0. Por otra parte, no se han encontrado en la bibliografía estudios que informen aumentos de pH en cultivos de levaduras en leche o en caseína.

Para continuar con los estudios de detección de péptidos con actividad biológica en estos HP, el pH de los mismos fue ajustado a un valor de 7,0.

## DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

---

La producción de aminoácidos y péptidos provenientes de la degradación de las proteínas de la leche por enzimas de BAL y levaduras aisladas de productos lácteos, y la utilización de dichos aminoácidos son una actividad metabólica central de tales microorganismos (Gobbetti y col., 2002). Bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos, requieren entre 4 y 14 aminoácidos para su normal desarrollo, dependiendo de la cepa en particular (Chopin, 1993). Sin embargo, la cantidad de aminoácidos libres y péptidos presentes en la leche es muy baja. Por lo tanto, las bacterias ácido lácticas y las levaduras dependen de un sistema proteolítico que les permita la degradación de las proteínas de la leche para su crecimiento y desarrollo (Juillard y col., 1995). Caseína, que comprende la mayor parte de las proteínas de la leche, contiene todos los aminoácidos necesarios para el crecimiento de las BAL y de las levaduras en leche, que les permitirán incluso alcanzar una alta densidad celular (Kunji y col., 1996).

Los aminoácidos y los péptidos producidos por hidrólisis enzimática de las proteínas de la leche por el sistema proteolítico tanto de BAL como de levaduras, así como la posterior utilización de tales aminoácidos, son una parte central e integral de su actividad metabólica. Durante la propagación, la leche no puede suministrar todos los aminoácidos esenciales necesarios para el crecimiento de dichos microorganismos en forma libre, por lo que éstos han desarrollado la capacidad de degradar las proteínas de la leche, principalmente caseína, mediante su sistema proteolítico, produciendo inicialmente péptidos y luego los aminoácidos necesarios para su crecimiento (Donkor y col., 2007).

La proteólisis producida por todas las cepas usadas en este estudio se evaluó durante 48 horas, a 37 °C para BAL y a 30 °C para levaduras. Durante el proceso de crecimiento microbiano se produjo un aumento de la cantidad de grupos aminos libres, debido a la hidrólisis de las diferentes caseínas o del sustrato comercial NZ-Case Plus por parte de las proteinasas presentes en las cepas de BAL o en las cepas de levaduras. Dicha extensión de proteólisis fue cuantificada como grado de hidrólisis (GH), utilizando el método del o-ftaladehído (OPA) según fue descrito por Nielsen y col. (2001).

**Tabla 28:** Determinación del grado de hidrólisis para los diferentes hidrolizados proteicos (HP) obtenidos de caseína y del sustrato comercial NZ-Case Plus

% Grado de Hidrólisis		
Cepas	Caseína	NZ-Case Plus
<i>L. plantarum</i> DBFIQ LP31	10,1 ± 0,2	6,4 ± 0,2
<i>L. helveticus</i> DBFIQ LH303	12,7 ± 0,5	6,3 ± 0,1
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DBFIQ LB92	14,7 ± 0,4	5,4 ± 0,3
<i>Enterococcus faecium</i> ETW4	9,7 ± 0,1	5,0 ± 0,3
<i>Enterococcus faecalis</i> DBFIQ E24	8,5 ± 0,1	6,0 ± 0,5
<i>Candida krusei</i> 1	7,2 ± 0,7	3,0 ± 0,6
<i>Candida famata</i> 24	9,4 ± 0,8	5,8 ± 0,1
<i>Brettanomyces custersii</i> 13	18,8 ± 0,3	6,1 ± 0,7
<i>Cryptococcus albidus</i> 8	8,7 ± 1,0	5,3 ± 0,1
<i>Candida incomunis</i> LTW1	10,4 ± 0,1	4,8 ± 0,3
<i>Dipodascus macrosporus</i> LTW4	13,6 ± 0,2	6,5 ± 0,5
<i>Candida blankii</i> LTW7	14,4 ± 0,4	4,6 ± 0,2
<i>Candida blankii</i> LTW9	9,4 ± 0,5	5,9 ± 0,2
<i>Candida inconspicua</i> LTW11	17,5 ± 0,9	5,1 ± 0,6
<i>Candida bertae</i> LTW14	13,3 ± 0,3	4,2 ± 0,3
<i>Candida neoformans</i> LTW3	16,0 ± 1,2	3,8 ± 0,2

Los porcentajes de inhibición fueron calculados con un intervalo de confianza del 95 %. Los resultados representan medias ± SD de tres experimentos independientes.

La Tabla 28 indica el GH para todos los HP obtenidos a partir de caseína y del sustrato comercial NZ-Case plus. Todos los HP presentaron un aumento en la cantidad de grupos aminos libres luego de 48 horas de cultivo. En lo que respecta a los HP de caseína, se puede apreciar que el porcentaje de GH fue dispar, encontrándose un valor mínimo de 7,2 % para el obtenido con la cepa de levadura *Candida krusei* 1, y un valor máximo de 18,8 % para el obtenido con la cepa de levadura *Brettanomyces custersii* 13. Se observa que, en general, no puede establecerse un patrón predecible de capacidad hidrolítica de la caseína para cada género de BAL o de levaduras ensayado, sino que dicha capacidad es variable según la especie y también de cepa a cepa.

Esta variación en el grado de hidrólisis de los HP obtenidos a partir de caseína, tanto por acción de bacterias ácido lácticas como por la de levaduras,

puede deberse a que las cepas y especies utilizadas poseen sistemas proteolíticos con diferente especificidad hacia caseína. De hecho, diferentes proteinasas han sido purificadas desde, por ejemplo, *Lactobacillus helveticus* (Zevaco y Gripon, 1988; Yamamoto y col., 1993), y algunas cepas pueden expresar más de una proteínasa en su superficie, con diferentes actividades proteolíticas (Gilbert y col., 1996).

Esta variación puede llegar a deberse también a que el reactivo OPA no es específico sólo para péptidos. OPA reacciona con cualquier grupo amino primario y así, cualquier componente con un grupo amino libre introducido en el medio de cultivo por cualquiera de las cepas utilizadas puede llegar a causar un aumento en los valores de porcentajes de hidrólisis (Fuglsang y col., 2003).

En cambio, para los HP obtenidos a partir del sustrato comercial NZ-Case Plus, el rango de variación de los porcentajes de GH fue mucho más acotado en todos los casos, encontrándose valores de hidrólisis comprendidos entre 3,8 y 6,5 %. Este resultado puede deberse a que el sustrato comercial empleado como fuente de nitrógeno para los microorganismos no pudo ser hidrolizado en mayor porcentaje debido a que el mismo es ya un hidrolizado caseínico, y por ende posee menos sitios de corte para los sistemas proteolíticos presentes en las cepas bacterianas y en las cepas de levaduras empleadas. La causa de esta menor variabilidad también puede ser atribuida a que dichos sistemas proteolíticos poseen una menor especificidad hacia los componentes del sustrato comercial.

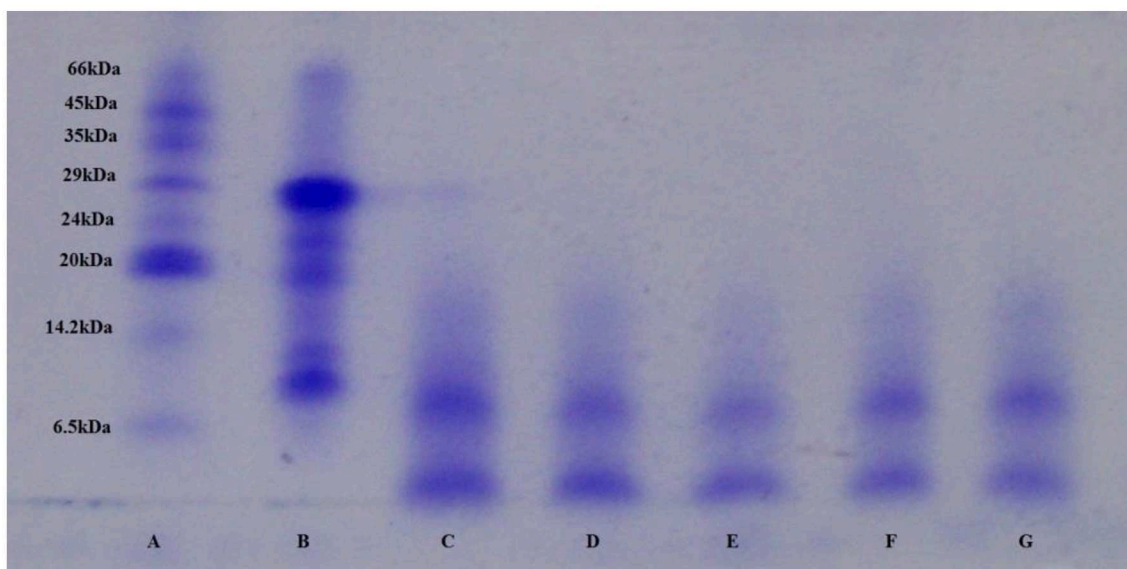
### **ANÁLISIS POR SDS-PAGE**

---

En las Figuras 32, 33 y 34 se pueden observar los resultados de la SDS-PAGE para todos los hidrolizados proteicos de caseína.

En la Figura 32 se muestran los resultados para todos los hidrolizados proteínicos obtenidos de caseína con cultivos de cepas de BAL, donde se puede ver la desaparición de las diferentes bandas de la caseína, obteniéndose péptidos y polipéptidos en cada HP que poseen un peso molecular menor a 14,2 kDa.

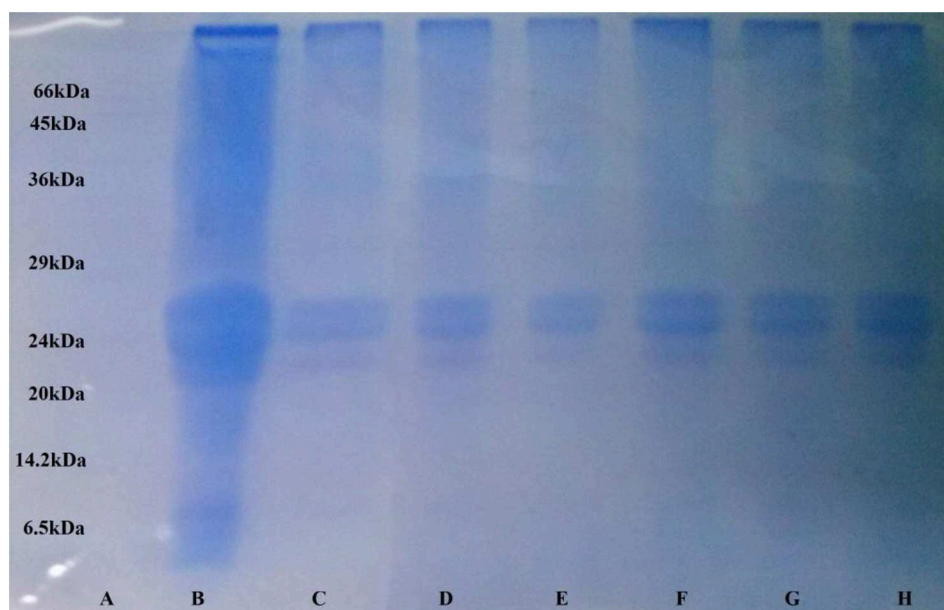
**Figura 32:** SDS-PAGE (porcentaje de gel de separación: 16 %) de la caseína hidrolizada con las cepas de BAL



**A:** Patrones de PM; **B:** Caseína; **C:** Caseína hidrolizada con *L. plantarum* DBFIQ LP31; **D:** Caseína hidrolizada con *L. helveticus* DBFIQ LH303; **E:** Caseína hidrolizada con *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* DBFIQ LB92; **F:** Caseína hidrolizada con *E. faecium* ETW4; **G:** Caseína hidrolizada con *E. faecalis* DBFIQ E24.

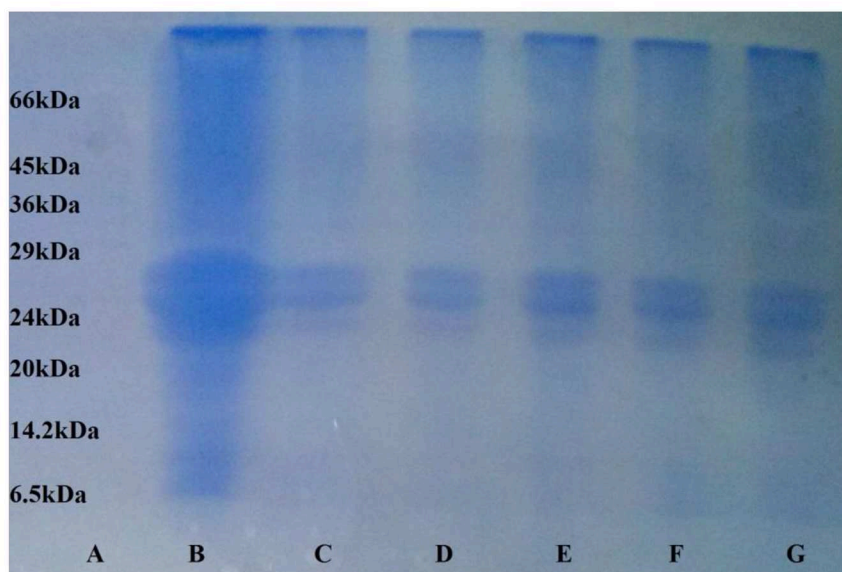
En las Figuras 33 y 34 se muestran los resultados para todos los hidrolizados de caseína con las cepas de levadura, donde se puede ver una gran disminución de las diferentes bandas de caseína en todos los HP, lo que sugiere la posible formación de péptidos y que los mismos tendrían un peso molecular menor a 6,5 kDa.

**FIGURA 33:** SDS-PAGE (porcentaje de gel de separación: 16 %) de la caseína hidrolizada con las cepas de levaduras



**A:** Patrones de PM; **B:** Caseína; **C:** Caseína hidrolizada con *Candida krusei* 1; **D:** Caseína hidrolizada con *Candida famata* 24; **E:** Caseína hidrolizada con *Brettanomyces custersii* 13; **F:** Caseína hidrolizada con *Cryptococcus albidus* 8; **G:** Caseína hidrolizada con *Candida incomunis* LTW1; **H:** Caseína hidrolizada con *Dipodascus macrosporus* LTW4.

**Figura 34:** SDS-PAGE (porcentaje de gel de separación: 16 %) de la caseína hidrolizada con las cepas de levaduras



**A:** Patrones de PM; **B:** Caseína; **C:** Caseína hidrolizada con *Candida blankii* LTW7; **D:** Caseína hidrolizada con *Candida blankii* LTW9; **E:** Caseína hidrolizada con *Candida inconspicua* LTW11; **F:** Caseína hidrolizada con *Candida bertae* LTW14; **G:** Caseína hidrolizada con *Cryptococcus neoformans* LTW3.

Tanto los resultados de porcentaje de GH como los de electroforesis, sugieren que caseína fue mejor sustrato que el producto comercial NZ-Case Plus para las proteinasas, tanto de las bacterias ácido lácticas como de las levaduras.

### **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA FRENTE A LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA**

Varias investigaciones han sugerido que alimentos, y en particular, alimentos fermentados tienen el potencial para influir en la salud del cerebro debido a una influencia directa de la microbiota consumida (Selhub y col., 2014). Reguladores de la plasticidad sináptica, tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro, pueden funcionar como moduladores metabólicos, respondiendo a señales periféricas tales como la ingesta de alimentos (Gómez-Pinilla, 2006). Por lo tanto, no es sorprendente que compuestos bioactivos de alimentos que incluyen ácidos grasos (Perica y Delas, 2011) o péptidos (Wang

y col., 2011) son actualmente de interés para su uso potencial en la prevención de desórdenes de la salud mental, tales como la enfermedad de Alzheimer. Además, péptidos bioactivos pueden ser producidos como resultado de procesos de fermentación (Hayes y col., 2007; Zeng y col., 2013).

La actividad inhibitoria frente a la enzima acetilcolinesterasa se determinó *in vitro*, empleando el método espectrofotométrico descrito por Ellman y col. (1961) y ensayando dos concentraciones de los hidrolizados proteicos: 0,5 y 1 % de cada HP obtenido tanto a partir de caseína como del sustrato comercial NZ-Case Plus.

En la Tabla 29 se pueden observar los resultados de inhibición frente a AChE de los hidrolizados obtenidos a partir de caseína, tanto por la acción proteolítica de cepas de BAL como por la de levaduras.



**Tabla 29:** Actividad inhibitoria frente a AChE de los hidrolizados proteicos obtenidos a partir de caseína

Cepas	Inhibición de AChE (%)	
	Caseína 1 %	Caseína 0,5 %
<i>L. plantarum</i> DBFIQ LP31	18,4 ± 0,8	13,5 ± 0,3
<i>L. helveticus</i> DBFIQ LH303	21,5 ± 1,2	23,2 ± 0,5
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DBFIQ LB92	19,0 ± 0,5	21,1 ± 0,2
<i>Enterococcus faecium</i> ETW4	11,3 ± 0,9	17,0 ± 1,1
<i>Enterococcus faecalis</i> DBFIQ E24	25,0 ± 0,8	14,0 ± 0,5
<i>Candida krusei</i> 1	N.I.	N.I.
<i>Candida famata</i> 24	N.I.	N.I.
<i>Brettanomyces custersii</i> 13	N.I.	N.I.
<i>Cryptococcus albidus</i> 8	N.I.	N.I.
<i>Candida incomunis</i> LTW1	N.I.	15,4
<i>Dipodascus macrosporus</i> LTW4	N.I.	9,1 ± 0,7
<i>Candida blankii</i> LTW7	N.I.	11,0 ± 1,0
<i>Candida blankii</i> LTW9	N.I.	5,4 ± 0,4
<i>Candida inconspicua</i> LTW11	N.I.	6,0 ± 0,6
<i>Candida bertae</i> LTW14	N.I.	7,9 ± 0,3
<i>Cryptococcus neoformans</i> LTW3em	N.I.	15,1 ± 0,7

N.I.: No Inhibió. Los porcentajes de inhibición fueron calculados con un intervalo de confianza del 95 %. Control positivo: Galantamina 200 mmol l<sup>-1</sup>; actividad inhibitoria frente a AChE: 88,0 ± 1,5 %.

A partir de los valores detallados en la Tabla 29 se puede afirmar, en primer término, que sólo se detectó una actividad inhibitoria ligera o nula de todas las soluciones peptídicas.

En lo que respecta a los hidrolizados peptídicos obtenidos a partir de las bacterias ácido lácticas, todos presentaron una ligera o pobre actividad inhibitoria frente a AChE, con valores comprendidos entre 11,3 y 25,0 %.

En lo que respecta a las soluciones peptídicas obtenidas por proteólisis con cultivos de levaduras, se puede apreciar que sólo algunos de ellos, obtenidos a partir de caseína al 0,5 % de concentración, presentaron una muy ligera actividad frente a AChE, con un valor máximo de 15,1 %.

**Tabla 30:** Actividad inhibitoria frente a AChE de los hidrolizados proteicos obtenidos a partir NZ-Case Plus

Cepas	Inhibición de AChE (%)	
	NZ-Case Plus 1 %	NZ-Case Plus 0,5 %
<i>L. plantarum</i> DBFIQ LP31	0,3 ± 0,1	N.I.
<i>L. helveticus</i> DBFIQ LH303	N.I.	N.I.
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DBFIQ LB92	N.I.	N.I.
<i>Enterococcus faecium</i> ETW4	N.I.	N.I.
<i>Enterococcus faecalis</i> DBFIQ E24	N.I.	N.I.
<i>Candida krusei</i> 1	N.I.	N.I.
<i>Candida famata</i> 24	N.I.	N.I.
<i>Brettanomyces custersii</i> 13	N.I.	N.I.
<i>Cryptococcus albidus</i> 8	N.I.	N.I.
<i>Candida incomunis</i> LTW1	1,4 ± 0,2	N.I.
<i>Dipodascus macrosporus</i> LTW4	3,5 ± 0,3	N.I.
<i>Candida blankii</i> LTW7	4,4 ± 0,1	2,7 ± 0,2
<i>Candida blankii</i> LTW9	2,4 ± 0,2	N.I.
<i>Candida inconspicua</i> LTW11	N.I.	N.I.
<i>Candida bertae</i> LTW14	N.I.	N.I.
<i>Cryptococcus neoformans</i> LTW3em	N.I.	N.I.

N.I.: No Inhibió. Los porcentajes de inhibición fueron calculados con un intervalo de confianza del 95 %. Control positivo: Galantamina 200 mmol l<sup>-1</sup>; actividad inhibitoria frente a AChE: 89,0 ± 2,3 %.

En la Tabla 30 se aprecia que, en el caso de los HP obtenidos a partir del sustrato comercial, tanto con las distintas cepas de BAL como con las de levaduras, la actividad inhibitoria frente a AChE fue insignificante. La mayoría de los HP no inhibieron a la enzima, y los pocos que sí lo hicieron mostraron una actividad muy escasa, con valores que no superaron el 4,4 %.

En la literatura no se han podido detectar estudios donde se hayan encontrado hidrolizados de caseína o de alguna otra proteína derivada de leche que hayan presentado actividad inhibitoria frente a la enzima acetilcolinesterasa.

Como fue dicho en el Capítulo I, son muy pocas las investigaciones que han encontrado péptidos o extractos peptídicos que inhiban a AChE. Sólo se ha observado actividad anti AChE de hidrolizados fraccionados de hígado de atún obtenidos con enzimas comerciales (Ahn y col., 2010), en alimentos fermentados (Liu y col., 2009; Chen y col., 2012), en péptidos presentes en salvado de arroz (Kannan y col., 2012), en veneno de serpientes (Mallender y col., 1998) y en péptidos obtenidos a partir de una biblioteca peptídica (Zhang y col., 2006).

### **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA FRENTE A LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA**

---

El incremento en la presión sanguínea puede ser reducido por el consumo de leches fermentadas por microorganismos, que contienen inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. Hidrolizados de proteínas de leche específicos o productos lácteos fermentados han demostrado inducir clínicamente reducciones significativas en la presión sanguínea sistólica y diastólica, sin reportar efectos adversos (von Huth Smith y col., 2007).

En este estudio se determinó la actividad inhibitoria *in vitro* frente a la enzima convertidora de angiotensina empleando el método espectrofotométrico descrito por Hayakari y col. (1978), con algunas modificaciones, y ensayando dos concentraciones de los hidrolizados proteicos: 0,5 y 1 % de cada HP obtenido tanto a partir de caseína como del sustrato comercial NZ-Case Plus.

**Tabla 31:** Actividad inhibitoria frente a ECA de todos los hidrolizados de caseína

Cepas	Inhibición de ECA (%)	
	Caseína 1 %	Caseína 0,5 %
<i>L. plantarum</i> DBFIQ LP31	19,4 ± 0,8	7,5 ± 0,5
<i>L. helveticus</i> DBFIQ LH303	15,0 ± 1,1	15,4 ± 1,0
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DBFIQ LB92	12,0 ± 0,9	6,5 ± 0,3
<i>Enterococcus faecium</i> ETW4	5,3 ± 0,2	5,4 ± 0,1
<i>Enterococcus faecalis</i> DBFIQ E24	1,0 ± 0,1	N.I.
<i>Candida krusei</i> 1	N.I.	N.I.
<i>Candida famata</i> 24	N.I.	N.I.
<i>Brettanomyces custersii</i> 13	N.I.	4,4 ± 0,1
<i>Cryptococcus albidus</i> 8	N.I.	11,5 ± 0,5
<i>Candida incomunis</i> LTW1	2,94 ± 0,1	N.I.
<i>Dipodascus macrosporus</i> LTW4	5,2 ± 0,2	N.I.
<i>Candida blankii</i> LTW7	14,2 ± 0,3	12,6 ± 0,3
<i>Candida blankii</i> LTW9	18,0 ± 0,5	N.I.
<i>Candida inconspicua</i> LTW11	25,0 ± 1,2	9,0 ± 0,2
<i>Candida bertae</i> LTW14	19,4 ± 0,9	13,5 ± 0,6
<i>Cryptococcus neoformans</i> LTW3	12,3 ± 0,7	N.I.

N.I.: No Inhibió. Los porcentajes de inhibición fueron calculados con un intervalo de confianza del 95 %. Captopril 0,04  $\mu\text{mol l}^{-1}$ : actividad inhibitoria frente a ECA del 91 ± 1,3 %.

La Tabla 31 muestra la actividad inhibitoria *in vitro* frente a ECA de todos los HP de caseína obtenidos a las dos concentraciones ensayadas. Las fracciones peptídicas solubles obtenidas con las cepas de BAL presentaron una actividad anti ECA baja o nula, con valores de inhibición que variaron desde 1 % a 19,4 %. El valor máximo se obtuvo con la cepa de *L. plantarum* DBFIQ LP31 y a una concentración de caseína del 1 %. En lo que respecta a los extractos peptídicos obtenidos con las diferentes cepas de levadura, se obtuvieron valores de inhibición comprendidos entre 2,94 y 25,0 %. La mayor actividad de inhibición se obtuvo con la cepa de *Candida inconspicua* LTW11, también a una concentración de caseína del 1 %.

**Tabla 32:** Actividad inhibitoria frente a ECA de todos los hidrolizados de NZ-Case Plus

Cepas	Inhibición de ECA (%)	
	NZ-Case Plus 1 %	NZ-Case Plus 0,5 %
<i>L. plantarum</i> DBFIQ LP31	15,3 ± 0,2	N.I.
<i>L. helveticus</i> DBFIQ LH303	15,9 ± 0,3	4,4 ± 0,2
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DBFIQ LB92	12,2 ± 0,6	6,0 ± 0,5
<i>Enterococcus faecium</i> ETW4	14,6 ± 0,2	1,4 ± 0,1
<i>Enterococcus faecalis</i> DBFIQ E24	8,6 ± 0,4	N.I.
<i>Candida krusei</i> 1	N.I.	N.I.
<i>Candida famata</i> 24	8,2 ± 0,5	N.I.
<i>Brettanomyces custersii</i> 13	5,5 ± 0,2	N.I.
<i>Cryptococcus albidus</i> 8	10,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1
<i>Candida incomunis</i> LTW1	N.I.	N.I.
<i>Dipodascus macrosporus</i> LTW4	12,3 ± 1,0	7,8 ± 0,3
<i>Candida blankii</i> LTW7	7,5 ± 0,7	3,3 ± 0,2
<i>C. blankii</i> LTW9	N.I.	N.I.
<i>Candida inconspicua</i> LTW11	4,4 ± 0,1	N.I.
<i>Candida bertae</i> LTW14	N.I.	N.I.
<i>Cryptococcus neoformans</i> LTW3	8,7 ± 0,3	2,5 ± 0,4

N.I.: No Inhibió. Los porcentajes de inhibición fueron calculados con un intervalo de confianza del 95 %. Captopril 0,04  $\mu\text{mol l}^{-1}$ : actividad inhibitoria frente a ECA del 93 ± 2,8 %.

En la tabla 32 se observan los resultados de inhibición *in vitro* frente a ECA de todos los HP obtenidos a partir del sustrato comercial NZ-Case Plus, a las dos concentraciones del mismo ensayadas. De forma, similar a lo ocurrido con los HP obtenidos por la acción de cepas de BAL sobre caseína, los fracciones peptídicas solubles obtenidas en este caso presentaron una actividad inhibitoria frente a ECA baja o nula, con valores comprendidos entre 1,4 % y 15,9 %. El valor máximo de actividad se obtuvo con la cepa de *Lactobacillus helveticus* DBFIQ LH303 a una concentración del 1 %. En lo referido a los hidrolizados obtenidos por levaduras, los valores de actividad anti ECA variaron entre 1,0 % y 12,3 %. Dichos resultados son menores que los

obtenidos con los HP derivados de la proteólisis de caseína por las mismas cepas de levadura.

En general, tanto las cepas de bacterias ácido lácticas como las de levaduras utilizadas en el estudio no fueron capaces de producir HP a partir de caseína o del sustrato comercial NZ-Case Plus que presentasen una actividad inhibitoria *in vitro* frente a la enzima convertidora de angiotensina que pudiese ser calificada como elevada o, al menos, considerable. La magnitud de la inhibición fue muy baja comparada con la obtenida por otros autores, y más aún si se la compara con la actividad de un inhibidor utilizado clínicamente como el captopril, cuyo valor de inhibición obtenido fue de 99,0 %, a una concentración de 0.04  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Dicho inhibidor se utilizó como control positivo del ensayo.

En otras investigaciones, las proteínas presentes en la leche han resultado ser precursoras de péptidos que presentaron actividad inhibitoria frente a ECA (Meisel, 1993; FitzGerald y Meisel, 1999; Takano, 2002). Se ha demostrado que una proteinasa con fuerte actividad proteolítica proveniente de *Lactobacillus helveticus* CP790, puede producir péptidos inhibidores de la ECA a partir de caseína (Yamamoto y col., 1994). Asimismo, la fermentación de la leche con starters integrados por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Lactobacillus helveticus* pueden producir péptidos inhibidores de la ECA. Péptidos antihipertensivos han sido encontrados en productos lácteos procesados (queso, leche, yogurt, etc.), tales como los lactotripéptidos isoleucina-prolina-prolina (Ile-Pro-Pro) y valina-prolina-prolina (Val-Pro-Pro), los cuales han sido aislados desde leche agria (Nakamura y col., 1995). En el suero de yogurt se detectó un dipéptido, tirosina-prolina (Tyr-Pro), el cual producía un significativo efecto antihipertensivo en ratas espontáneamente hipertensas (Yamamoto y col., 1999).

También, se han encontrado péptidos con actividad inhibitoria frente a ECA generados por hidrólisis enzimática de caseína. Así por ejemplo, la hidrólisis de caseína con pepsina ha generado péptidos antihipertensivos. Los péptidos más potentes encontrados en estos hidrolizados corresponden a las secuencias Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr, Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu y Tyr-Gln-Lys-Phe-Pro-Gln-Tyr. Hay que destacar que el efecto antihipertensivo encontrado para los péptidos Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr y Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu es

comparable a la actividad de Val-Pro-Pro, un péptido antihipertensivo actualmente incluido en alimentos funcionales (Sharma y col., 2011).

Sin embargo, otros autores han encontrado hidrolizados derivados de la leche, que han presentado ligera o nula actividad inhibitoria frente a ECA (Pihlanto-Leppälä y col., 1998), lo que resulta coincidente con los resultados obtenidos en este trabajo. Estos resultados pueden deberse a la baja actividad proteolítica de las cepas de BAL o de levaduras hacia caseína o hacia el sustrato comercial, así como también a la especificidad de las enzimas proteolíticas presentes en dichos microorganismos.

Además, la producción de péptidos con actividad inhibitoria frente a ECA ha sido documentada también por la acción proteolítica de algunas especies de levaduras tales, como *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida parapsilosis*, sobre ciertas proteínas (Didelot y col., 2006; Hamme y col., 2009; Jang y Lee, 2011; Kuwabara y col., 1995).

En un estudio realizado por Chavez-López y col. (2012), se determinó que ocho de 93 cepas de levadura fueron capaces de producir péptidos inhibidores de ECA que redujeron la actividad de la enzima desde un 8,69 % hasta un 89,19 %. Aparentemente, esta característica no se limitó a una sola especie de levadura pero si fue dependiente de la cepa. Las cepas de *Pichia kudriavzevii* fueron las más eficientes para hidrolizar las proteínas de la leche en péptidos con alta actividad inhibitoria frente a ECA, con valores de inhibición que van de un 72 % (cepa KL84A) a un 89 % (cepa KL52). Otras cepas tales como *Kluyveromyces marxianus* KL26A, *Candida lusitaniae* KL4A y *Torulaspora delbrueckii* KL66A, también mostraron altos valores de actividad (80 %, 76 % y 74 % respectivamente).

Hamme y col. (2009) informaron la detección de una actividad inhibitoria del 45 % en lactosuero fermentado con una cepa de *Kluyveromyces marxianus*, mientras que Jang y Lee (2011) encontraron una inhibición del 67,8 % en vino rojo fermentado con una cepa de *S. cerevisiae*.

Chavez-López y col. (2014) ensayaron diferentes cultivos combinando diferentes cepas de BAL y de levaduras, lo que les permitió obtener péptidos con actividad antihipertensiva a partir de leche fermentada. La combinación más efectiva ya que mostró la mayor actividad inhibitoria frente a ECA fue

obtenida con *Pichia kudriavzevii* KL84A, *Lactobacillus plantarum* LAT3, *Enterococcus faecalis* KL06.

### **ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

---

Proteínas y péptidos bioactivos derivados de la leche han sido reportados por proveer una defensa contra enfermedades no inmunes y al control de infecciones microbianas. La actividad antimicrobiana de la leche es principalmente atribuida a inmunoglobulinas y a proteínas no inmunes, tales como lactoferrina, lactoperoxidasa y lisozima. Esto puede ser debido a la actividad sinérgica de proteínas y péptidos que ocurren naturalmente en adición a los péptidos generados desde proteínas precursoras inactivas (Gobbetti y col., 2004). Se ha demostrado, que proteínas de la leche actúan también como precursoras de péptidos antimicrobianos, y de esta manera podrían aumentar la defensa natural del organismo contra patógenos invasores. Es actualmente bien documentado que péptidos bioactivos pueden ser generados durante la fermentación de la leche por la actividad proteolítica de los cultivos starters. Como resultado, péptidos con varias bioactividades pueden ser encontrados en los productos finales, tales como varios quesos y leches fermentadas. Estos productos lácteos tradicionales pueden bajo ciertas condiciones tener efectos saludables específicos cuando son ingeridos como parte de la dieta diaria. La actividad de dichos péptidos biofuncionales está basada en su secuencia y composición aminoacídica inherente. El tamaño de la secuencia activa puede variar desde dos a 20 residuos de aminoácidos y muchos péptidos además, son conocidos por tener propiedades multifuncionales (Meisel y FitzGerald, 2003).

El ensayo de actividad antimicrobiana empleando el método de difusión en agar descrito por Tagg y Mc Given, (1971) se realizó frente a cuatro cepas bacterianas causantes de enfermedades de transmisión alimentaria o alterantes de alimentos, tres cepas Gram (+): *Listeria monocytogenes* DTUNLu 328, *Bacillus cereus* DBFIQ B 28, *Staphylococcus aureus* DBFIQ S 21; y una cepa Gram (-): *Escherichia coli* DBFIQ Ec 9.

Dichas cepas pertenecen a la colección de las Cátedras de Microbiología y Biotecnología, del Dto. de Ingeniería en Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) – Universidad Nacional del Litoral (UNL).



La totalidad de los HP obtenidos a partir tanto de caseína como del sustrato comercial NZ-Case Plus obtenidos por las diferentes cepas de BAL y de levaduras no presentaron actividad inhibitoria frente a ninguna de las cepas bacterianas ensayadas.

Sin embargo, en las últimas décadas un número importante de péptidos antimicrobianos codificados en la estructura primaria de caseína y de otras proteínas de la leche han sido reportados por varios autores. Tales péptidos antimicrobianos se han obtenidos principalmente por hidrólisis con enzimas digestivas (tripsina, pepsina, etc.), y también con cultivos de starters microbianos o con enzimas microbianas empleando a algunas de las proteínas presentes en la leche o en productos lácteos como ser diferentes variedades de quesos o leches fermentadas.

Lactenina fue probablemente el primer factor antibacteriano derivado de la leche tratada con rennet (Jones y Simms, 1930). Péptidos liberados de caseína tratada con quimotripsina (Lahov y col., 1971), llamados casecinas mostraron propiedades bactericidas contra *lactobacilli* y también frente a varias bacterias patogénicas tales como *Staphylococcus aureus*. Otro péptido antibacteriano derivado de  $\alpha_{s1}$ -caseína tratado con quimosina, llamado isracidina, el cual corresponde a la región N-terminal de esta proteína (f1-23), fue aislado (Hill y col., 1974). Isracidina fue encontrado por inhibir el crecimiento *in vitro* de *lactobacilli* y otras bacterias Gram (+), pero solo a altas concentraciones (0,1 – 1 mg ml<sup>-1</sup>). Sin embargo, *in vivo*, isracidina ejerce un fuerte efecto antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Listeria monocytogenes*.

$\alpha_{s2}$ -caseína bovina mostró ser precursora de varios fragmentos peptídicos con actividad antibacteriana. Uno de tales péptidos, correspondiente a  $\alpha_{s2}$ -CN f150–188, el cual fue aislado de leche acidificada y hervida y denominado casocidina-I (Zucht y col., 1995), mostró actividad inhibitoria contra bacterias Gram (-) (*Escherichia coli*) y Gram (+) (*Staphylococcus carnosus*). La hidrólisis de  $\alpha_{s2}$ -CN con la enzima gástrica pepsina originó dos diferentes péptidos antibacterianos (Recio y Visser, 1999): uno, f164-179, el cual fue incluido en la casocidina-I y un nuevo fragmento antibacteriano en el extremo C-terminal de la proteína, f183-207.

Dos reportes (Liepke y col., 2001; Malkoski y col., 2001) han mostrado un efecto directo de inhibición bacteriana de péptidos N-derivados. Uno de estos péptidos, llamado Kappacina, corresponde al caseinomacropéptido bovino fosforilado, no glicosilado ( $\kappa$ -CN f106-169), el cual ha presentado actividad inhibitoria del crecimiento contra bacterias Gram (+) (*Streptococcus mutans*) y contra bacterias Gram (-) (*Porphyromonas gingivalis*).

Lactoferricina, un péptido antibacteriano aislado desde un hidrolizado péptico de lactoferrina bovina y humana (f17-41 y f1-47, respectivamente) ha mostrado inhibición contra una amplia variedad de especies microbianas, incluyendo varios patógenos importantes transmitidos por alimentos, como ser *Listeria monocytogenes* (Bellamy y col., 1992; Malkoski y col., 2001).

La digestión proteolítica de  $\beta$ -lactoglobulina por tripsina produjo 4 fragmentos peptídicos con actividad bactericida. Estos péptidos corresponde a las regiones f15-20, f25-40, f78-83 y f92-100 de  $\beta$ -lactoglobulina (Pellegrini y col., 2001) y presentaron efectos bactericidas solamente contra bacterias Gram (+).

El uso de LAB o de sus proteasas para generar péptidos bioactivos desde proteínas de la leche está atrayendo cada vez más atención, y tales péptidos bioactivos se esperan por ser fundamentalmente diferentes de aquellos liberados por proteinasas digestivas las cuales difieren de las proteinasas microbianas en especificidad y en modo de acción (Atlan y col., 1990; Laloi y col., 1991; Sasaki y col., 1995; Matar y col., 2003).

Pocos estudios, sin embargo, han sido llevado a cabo para identificar los péptidos generados desde proteínas de la leche por LAB con respecto a sus actividades biológicas; y la mayoría de tales estudios se han centrado en las propiedades que promueven la salud (Clare y Swaisgood, 2000; Gobbetti y col., 2000; Quirós y col., 2007).

En un estudio en péptidos liberados desde caseinatos de leche de diferentes mamíferos domésticos bajo digestión con una proteinasa parcialmente purificada desde *Lactobacillus helveticus* PR4, Minervini y col. (2003) ha reportado que entre los numerosos péptidos bioactivos resultantes, solo un péptido derivado del hidrolizado de  $\beta$ -caseína humana ( $\beta$ -CN f(184-210)), exhibió actividad antibacteriana. Este péptido mostró un muy amplio espectro de acción contra bacterias Gram (+) y Gram (-), incluyendo *Enterococcus*

*faecium*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli* K-12, *Listeria innocua*, *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica* y *Staphylococcus aureus*.

En otro trabajo, Gagnaire y col. (2001) encontraron una diversidad de péptidos en quesos variedad Emmental, donde algunos de ellos presentaron actividad antimicrobiana (Korhonen, 2009).

Más recientemente, Hayes y col. (2006) proporcionó evidencias adicionales para la generación de péptidos por fermentación de caseína de leche con LAB. En este, estudio, caseinato de sodio de  $\alpha_{s2}$ -caseína bovina fue fermentada con una cepa proteolítica de *Lactobacillus acidophilus*, revelando la presencia de tres péptidos antibacterianos cortos, los cuales han sido designados como caseínas A ( $\alpha_{s1}$ -CN f(21-29), secuencia: IKHQGLPQE), B ( $\alpha_{s1}$ -CN f(30-37), secuencia: VLNENLLR) y C ( $\alpha_{s1}$ -CN f(195-208) secuencia: SDIPNPIGSENSEK). Las caseínas A y B ejercen una potente actividad inhibitoria frente a bacterias Gram (+) y Gram (-) incluyendo patógenos de transmisión alimentaria que afectan la salud, tales como *Listeria innocua*, *Escherichia coli* O157:H7, *Enterobacter sakazakii* y *Streptococcus mutans* (Hayes y col., 2006).

## CONCLUSIONES PARCIALES

---

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos del estudio y evaluación “*in vitro*” de la actividad inhibitoria frente a AChE y ECA y de la actividad antimicrobiana de hidrolizados proteicos obtenidos de la hidrólisis de caseína y del sustrato comercial NZ-Case Plus empleando bacterias ácido lácticas y levaduras.

En función de esos resultados, se pueden formular las siguientes conclusiones parciales:

- El método de obtención de los HP libres de células resultó adecuado en todos los casos. La hidrólisis tanto de las diferentes caseínas como del sustrato comercial NZ-Case Plus por parte de todas las cepas de BAL y levaduras fue confirmada tanto por SDS-PAGE como por determinación del grado de hidrólisis.
- Todas las cepas ensayadas mostraron poseer capacidad de metabolizar tanto a las distintas caseínas como al sustrato comercial NZ-Case Plus, lo cual fue corroborado por determinación del contenido proteico.
- Todos los cultivos destinados a la obtención de HP presentaron modificación del pH debida al desarrollo de las cepas ensayadas. Las BAL produjeron un descenso del pH en todos los casos, mientras que para las levaduras se observó tanto descenso como aumento del pH, dependiendo de la cepa empleada.
- Se ha comprobado que todos los HP no presentaron buena actividad inhibitoria tanto frente a AChE como a ECA ni tampoco presentaron actividad antimicrobiana frente a las cuatro cepas bacterianas ensayadas.



# **CONCLUSIONES FINALES**

## CONCLUSIONES FINALES

---

En la actualidad se asume plenamente que los alimentos, además de desempeñar el papel de nutrientes, pueden aportar compuestos bioactivos para el organismo humano, proporcionando beneficios para la salud y reduciendo el riesgo de padecer ciertas enfermedades.

Investigaciones realizadas en lo referente al diseño y a la elaboración de alimentos funcionales han dedicado especial atención al estudio del papel fisiológico de las proteínas de la dieta, y más precisamente, al de los fragmentos o péptidos bioactivos encriptados dentro de las estructuras de dichas proteínas. Tales péptidos bioactivos son considerados como potenciales compuestos sumamente promisorios para ser empleados en el tratamiento o la prevención de ciertas enfermedades.

En este trabajo de Tesis se evaluó la capacidad de generar extractos peptídicos a partir de la hidrólisis, por la acción de enzimas proteolíticas, de manoproteínas obtenidas de diferentes cepas de levaduras. Por otra parte, también se evaluó la posibilidad de obtener hidrolizados proteínicos originados por el desarrollo de bacterias ácido lácticas (BAL) o de levaduras en soluciones preparadas con caseína o con el sustrato (hidrolizado) comercial NZ-Case Plus. Posteriormente se determinaron sus propiedades bioactivas, evaluando su capacidad de inhibir a las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) (prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer) y enzima convertidora de angiotensina (ECA) (capacidad antihipertensiva), así como su capacidad antimicrobiana. Además, se avanzó en el análisis estructural de las fracciones que presentaron una buena y promisoriosa actividad inhibitoria frente a la enzima acetilcolinesterasa.

La actividad antimicrobiana de los extractos hidrolizados de manoproteínas se pudo corroborar frente a las cepas de *Bacillus cereus* DBFIQ B 28 y *Listeria monocytogenes* tipo I DTUNLu 328, y la misma resultó ser dependiente del tratamiento enzimático aplicado al extracto proteico original. En general, los extractos doblemente hidrolizados fueron más activos, y únicamente algunos de los extractos hidrolizados sólo con tripsina fueron capaces de inhibir a dichas cepas bacterianas. La determinación de la cinética de crecimiento de las cepas blanco antes mencionadas, en presencia o ausencia de dos de los

extractos más activos, permitió observar un efecto sólo bacteriostático frente a ambas especies bacterianas.

Es importante destacar como resultado altamente promisorio el hecho de que 6 extractos hidrolizados de manoproteínas presentaron buena actividad antiacetilcolinesterasa. Dichos extractos fueron: el de *Candida blankii* LTW7 hidrolizado con tripsina, con tripsina/quimotripsina y con pepsina/quimotripsina; el de *Saccharomyces cerevisiae* DBFIQ L2 hidrolizado con proteinasa K y con pepsina/quimotripsina; y el de *Pichia anomala* LTW6 hidrolizado con pepsina/quimotripsina.

El fraccionamiento por cromatografía en fase reversa permitió obtener 6 fracciones que inhibieron de forma considerable a AChE. Entre ellas, las fracciones obtenidas al 15 % de acetonitrilo del extracto de *C. blankii* LTW7 hidrolizado tanto con tripsina como con pepsina/quimotripsina, presentaron la actividad más alta, con un valor del 64 % de inhibición.

Los avances logrados en el conocimiento de los aspectos estructurales de las fracciones manoproteínicas permitieron corroborar la presencia de péptidos y glicopéptidos en las diferentes fracciones activas frente a AChE. Del mismo modo, manosa, glucosa y glucosamina fueron los residuos de azúcares detectados en esas fracciones.

El fraccionamiento mediante cromatografía de afinidad permitió separar los péptidos de los glicopéptidos presentes en cada fracción, siendo estos últimos los que presentaron la mayor actividad frente a AChE. Por otra parte, la fracción glicopeptídica de *Candida blankii* LTW7 hidrolizada con pepsina/quimotripsina resultó ser la que presentó mayor actividad antiacetilcolinesterasa, con un valor del 77,8 % de inhibición.

Con respecto a los hidrolizados proteicos obtenidos a partir de caseína o del sustrato comercial N-Z Case Plus con diferentes cepas de bacterias ácido lácticas o de levaduras, los mismos no resultaron ser poseedores de propiedades antiacetilcolinesterasa o antihipertensiva de consideración, así como tampoco de actividad antimicrobiana.

Por ende, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis demuestran que los péptidos/glicopéptidos liberados por hidrólisis enzimática de extractos de manoproteínas de levaduras, que fueron activos frente a la enzima acetilcolinesterasa, pueden ser potenciales componentes de alimentos

funcionales o de nutraceuticos. Si bien es necesario continuar con nuevos estudios para aislar e identificar a los péptidos responsables de dicha actividad biológica, así como cuantificar su contribución a la misma, es importante destacar que en la bibliografía consultada no se han podido encontrar investigaciones previas sobre esta actividad, relacionadas con péptidos obtenidos de manoproteínas de levaduras. Por lo tanto y a nuestro conocimiento, éste sería uno de los primeros trabajos científicos dedicados a este tema específico, y podría constituir un aporte muy original en esta temática, con las potenciales consecuencias que implica para la formulación de nuevos agentes terapéuticos y de alimentos funcionales.

En función de estas perspectivas, se considera que se deberá continuar en el futuro con estas investigaciones, profundizando en el conocimiento acerca del aislamiento, la purificación y la caracterización de los péptidos/glicopéptidos con actividad anticolinesterásicas, presentes en las fracciones que demostraron poseer la mayor actividad.

Por otra parte y también como perspectiva futura, una vez que se hayan aislado y caracterizado completa e inequívocamente los péptidos/glicopéptidos responsables de la bioactividad, podrá llevarse a cabo síntesis química de sus miméticos, e incluso modificarlos a fin de evaluar posibles mejoras en su actividad. Para ello se considera explorar en futuros trabajos cuáles regiones de estas secuencias podrían estar asociadas a la actividad inhibitoria de esta enzima, lo cual podría llevarse a cabo mediante estudios teóricos de la interacción enzima-inhibidor, dinámica molecular y docking de los distintos ligandos en el sitio activo de la enzima.

En el campo de los extractos que presentaron actividad antimicrobiana se llevará al cabo el fraccionamiento de los mismos, corroborando la actividad *in vitro* de cada fracción obtenida. Además, se realizará la determinación de la actividad antimicrobiana frente a otras cepas de bacterias blanco alterantes de alimentos o causantes de enfermedades de transmisión alimentaria.

Se considera que este trabajo constituye una primera contribución en esta temática, pero que aún resta mucho por continuar investigando en este campo, especialmente en relación con la actividad antiacetilcolinesterasa y antimicrobiana, tanto de los extractos manoproteínicos como de las fracciones peptídicas y glicopeptídicas obtenidas de los mismos.



Esto cobra especial relevancia si se tiene en cuenta lo ya expresado previamente acerca de la ausencia prácticamente total de investigaciones previas sobre esta temática en la bibliografía a la que se ha tenido acceso. Por lo tanto, este trabajo constituye una primera incursión en un campo poco explorado, o casi inexplorado, que puede brindar herramientas muy útiles para el mejoramiento de la salud humana, focalizada tanto desde el punto de vista de las tecnologías alimentarias (prevención) como del de las del diseño de nuevos fármacos más eficaces (tratamiento).



# **BIBLIOGRAFÍA**



**BIBLIOGRAFÍA**

---

- Abubakar, A.; Saito, T.; Kitazawa, H.; Kawai, Y. e Itoh, T. (1998) *Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion*. J. Dairy Sci. 81: 3131 - 3138.
- Aguilar-Uscanga, B. y Francios, J. M. (2003) *A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation*. Lett. Appl. Microbiol. 37(3): 268 - 274.
- Ahn, C. B.; Lee, K. H. y Je, J. Y. (2010) *Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from tuna liver: effect of enzymes and molecular weight on bioactivity*. Int. J. Food Sci. Technol. 45: 562 - 568.
- Anonymous (2005) *Breastfeeding and the use of human milk*. Pediatrics. 115: 496 - 506.
- Arihara, K.; Nakashima, Y.; Mukai, T.; Iahikawa, T. y Itoh, M. (2001) *Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins*. Meat Sci. 57: 319 - 324.
- Atlan, D.; Laloi, P. y Portalier, R. (1990) *X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus: characterization of the enzyme and isolation of deficient mutants*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2174 - 2179.
- Bakhle, Y. S. (1968) *Conversion of angiotensin I to angiotensin II by cell-free extracts of dog lung*. Nature. 220: 919 - 921.
- Baumann, W. K.; Bizzozero, S. A. y Dutler, H. (1970) *Specificity of  $\alpha$ -chymotrypsin. Dipeptide substrates*. FEBS Letters. 8: 257 - 260.
- Behrens, P. M. I. y Vergara, E. F. (2007) *One hundred years of Alzheimer's disease: Immunotherapy a hope?* Rev. Med. Chil. 135(1): 103 - 10.
- Bejaoui, H.; Mathieu, F.; Taillandier, P. y Lebrihi, A. J. (2004) *Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological Saccharomyces strains*. Appl. Microbiol. 97: 1038 - 1044.
- Bellamy, W.; Takase, M.; Yamauchi, K.; Wakabayashi, H.; Kawase, K. y Tomita, M. (1992) *Identification of the bactericidal domain of lactoferrin*. Biochim. Biophys. Acta. 1121: 130 - 136.

- Berciano Blanco, J. (2006) *Enfermedades degenerativas del sistema nervioso. Demencias. Enfermedad de Alzheimer*. En: *Medicina Interna*. (Eds.: Farreras, P. y Rozman, C.) 15ª edición. Editorial Elseiver, Madrid, España, vol II: 1486 - 1489.
- Blasco, L.; Viñas, M. y Villa, T. G. (2011) *Proteins influencing foam formation in wine and beer: the role of yeast*. *Int. Microbiol.* 14: 61 - 71.
- Blum, H.; Beier, H. y Gross, H. J. (1987) *Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels*. *Electrophoresis.* 8: 93 - 99.
- Bolscher, J. G. M.; van der Kraan, M. I. A.; Nazmi, K.; Kalay, H.; Grün, C. H.; van't Hof, W.; Veerman, E. C. I. y Nieuw Amerongen, A. V. (2006) *A one-enzyme strategy to release an antimicrobial peptide from the LFampin-domain of bovine lactoferrin*. *Peptides.* 27: 1 - 9.
- Brantl, V. (1984) *Novel opioid peptides derived from human  $\beta$ -casein*. *Eur. J. Pharmacol.* 106: 213 - 214.
- Britton, J. R. y Kastin, A. J. (1991) *Biologically-active polypeptides in milk*. *Am. J. Med. Sci.* 301: 124 - 132.
- Broekaert, W. F.; Terras, F. R.; Cammue, B. P.; Osborn, R. W. (1995) *Plant defensins: Novel antimicrobial peptides as components of the host defense system*. *Plant Physiol.* 108: 1353 - 1358.
- Brown, W. y Wold, F. (1973) *Alkyl isocyanates as active-site-specific reagents for serine proteases. Reaction properties*. *Biochemistry.* 12: 828.
- Burkey, T. E.; Dritz, S. S.; Nietfeld, J. C.; Johnson, B. J. y Minton, J. E. (2004) *Effect of dietary mannanoligosaccharide and sodium chlorate on the growth performance, acute-phase response, and bacterial shedding of weaned pigs challenged with Salmonella enterica serotype Typhimurium*. *J. Anim. Sci.* 82: 397 - 404.
- Cabib, E.; Roh, D. H.; Schmidt, M.; Crotti, L.B. y Varma, A. (2001) *The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis*. *J. Biol. Chem.* 276: 19679 - 19682.
- Cameron, D.; Cooper, D. y Neufeld R. (1988) *The mannoprotein of Saccharomyces cerevisiae is an effective bioemulsifier*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1420 - 1425.

- Caridi, A.; Galvano, F.; Tafuri, A. y Ritieni, A. (2006) *Ochratoxin A removal during winemaking*. *Enzyme Microb. Tech.* 40: 122 - 126.
- Cetin, N.; Güclü, B. K. y Cetin, E. (2005) *The effects of probiotics and mannanoligosaccharide on some haematological and immunological parameters in Turkeys*. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 52: 263 - 267.
- Chabance, B.; Marteau, P.; Rambaud, J. C.; Migliore-Samour, D.; Boynard, M.; Perrotin, P.; Guillet, R., Jolles, P. y Fiat, A. M. (1998) *Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk and yogurt*. *Biochimie.* 80: 155 - 165.
- Chabance, B.; Jolles, P.; Izquierdo, C.; Mazoyer, E.; Francoual, C.; Drouet, L. y Fiat, A. M. (1995) *Characterization of an antithrombotic peptide from  $\beta$ -casein in newborn plasma after milk ingestion*. *Brit. J. Nutr.* 73: 582 - 590.
- Chan, D. I.; Prenner, E. J. y Vogel, H. J. (2006) *Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action*. *BBA Biomembranes.* 1758: 1184 - 1202.
- Chaves-López, C.; Tofalo, R.; Serio, A.; Paparella, A.; Sacchetti, G. y Suzzi, G. (2012) *Yeasts from Colombian Kumis as source of peptides with angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk*. *Int. J. Food Microbiol.* 159: 39 - 46.
- Chaves-López, C.; Serio, A.; Paparella, A.; Martuscelli, M.; Corsetti, A.; Tofalo, R. y Suzzi, G. (2014) *Impact of microbial cultures on proteolysis and release of bioactive peptides in fermented milk*. *Food Microbiol.* 42: 117 - 121.
- Chen, J.; Quan, M. H.; Cheng, Y. Q.; Sun, J. y Li, L. T. (2012) *Acetylcholinesterase inhibitory activity of Chinese sufu (fermented tofu) ethanol-extract*. *Food Chem.* 134: 1263 - 1266.
- Chen, N.; Zou, J.; Wang, S.; Ye, Y.; Huang, Y.; Gadda, G. y Yang, J. (2009) *Designing protease sensors for real-time imaging of trypsin activation in pancreatic cancer cells*. *Biochemistry.* 48: 3519.
- Cheung, H. S. y Cushman, D. W. (1973) *Inhibition of homogeneous Angiotensin I converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of *Bothrops jararaca**. *Biochim. Biophys. Acta.* 293: 451 - 463.

- Cheung, H. S.; Wang, F. L.; Ondetti, M. A.; Sabo, E. F. y Cushman, D. W. (1980) *Binding of peptides substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme*. J. Biol. Chem. 25: 401 - 407.
- Chopin, A. (1993) *Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria*. FEMS Microbiol. Rev. 12: 21 - 39.
- Cid, V. J.; Duran, A.; Del Rey, F.; Snyder, M. P.; Nombela, C. y Sanchez, M. (1995) *Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev. 59: 345 - 386.
- Clare, D. A. Catignani, G. L. y Swaisgood, H. E. (2003) *Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides*. Curr. Pharm. Des. 9: 1239 - 1255.
- Clare, D. A. y Swaisgood, H. E. (2000) *Bioactive milk peptides: a prospectus*. J. Dairy Sci. 83: 1187 - 1195.
- Cook, J. J.; Huang, T. F.; Rucinsky, B.; Tuma, R. F.; Williams, J. A. y Niewiarowski, S. (1988) *Inhibition of platelet hemostatic plug formation by trigramin, a novel RGD peptide*. Am. J. Physiol. 256: 1238 - 1243.
- Creamer, L. K. y MacGibbon, A. K. H. (1996) *Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids*. Int. Dairy J. 6: 539 - 568.
- Curis, J. M.; Debnnes, D.; Waddell, D. S.; Macgillivray, T. y Ewart, H. S. (2002) *Determination of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide Leu-Lys-Pro-Asn-Met (LKPNM) in bonito muscle hydrolysates by LC-MS/MS*. J. Agric. Food Chem. 55: 3919 - 3925.
- Cushman, D. W.; Cheung, H. S.; Sabo, E. F. y Ondetti, M. A. (1977) *Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids*. Biochemistry. 16: 5484 - 5491.
- Cushman, D. W.; Pluscec, J.; Williams, N. J.; Weaver, E. R.; Sabo, E. F.; Kocy, O.; Cheung, H. S. y Ondetti, M. A. (1973). *Inhibition of angiotensin-converting enzyme by analogs of peptides from Bothrops jararaca venom*. Experientia. 29: 1032 - 1035.
- Custódio, L.; Justo, T.; Silvestre, L.; Barradas, A.; Duarte, C. V.; Pereira, H.; Barreira, L.; Rauter, A. P.; Alberício, F. y Varela, J. (2012) *Microalgae of*

*different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities.* Food Chem. 131: 134 - 140.

Davies, P. y Maloney, A. J. (1976) *Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease.* Lancet 2: 1403.

Davis, M. E.; Maxwell, C. V.; Brown, D. C.; de Rodas, B. Z.; Johnson, Z. B.; Kegley, E. B.; Hellwig, D. H. y Dvorak, R. A. (2002) *Effect of dietary mannan oligosaccharides and(or) pharmacological additions of copper sulfate on growth performance and immunocompetence of weanling and growing/finishing pigs.* J. Anim. Sci. 80: 2887 - 2894.

Dekosky, S. T.; Harbaugh, R. E.; Schmitt F. A.; Bakay, R. A.; Chui, H. C.; Knopman, D. S.; Reeder, T. M.; Shetter, A. G.; Senter, H. J. y Markesbery, W. R. (1992) *Cortical biopsy in Alzheimer's disease: diagnostic accuracy and neurochemical, neuropathological, and cognitive correlations.* Intraventricular Bethanecol Study Group. Ann. Neurol. 32: 625 - 632.

den Dunnen, W. F.; Brouwer, W. H.; Bijlard, E.; Kamphuis, J.; van Linschoten, K.; Eggens-Meijer, E. y Holstege, G. (2008) *No disease in the brain of a 115-year-old woman.* Neurobiol. 29: 1127 - 32.

De-Noni, I. (2008) *Release of  $\beta$ -casamorphin 5 y 7 during simulated gastrointestinal digestion of bovine  $\beta$ -casein variants and milk-based infant formulas.* Food Chem. 110: 897 - 903.

Devomoy, K. L.; Martin, R. F.; Nigel, H. G. y Kumar, S. (2003) *Current drug targets Alzheimer's disease treatment.* Drug Dev. Res. 56: 267 - 281.

Didelot, S.; Bordenave-Juchereau, S.; Rosenfeld, E.; Piot, J. M. y Sannier, F. (2006) *Peptides released from acid goat whey by a yeast-lactobacillus association isolated from cheese microflora.* J. Dairy Rev. 73: 163 - 170.

Diplock, A. T.; Aggett, P. J.; Ashwell, M.; Bornet, F.; Fern, E. B. y Roberfroid, M. B. (1998) *Scientific concepts of functional foods in Europe, consensus document.* Bruselas: ILSI Europa, pp. 17.

Donkor, O. N.; Henriksson, A.; Vasiljevic, T. y Shan, N. P. (2007). *Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk.* Lait. 87: 21 - 38.

- Drouet, L.; Bal dit Sollier, C.; Cissie, M.; Pignaud, G.; Mazoyer, E.; Fiat, A. M.; Jolles, P. y Caen, J. P. (1990) *The antithrombotic effect of KRDS, a lactotransferrin peptide, compared with RGDS*. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 32: 59 - 62.
- Dupin, I. V. S.; Stockdale, V. J.; Williams, P. J.; Jones, G. P.; Markides, A. J. y Waters, E. J. (2000) *Saccharomyces cerevisiae mannoproteins that protect wine from protein haze: Evaluation of extraction methods and immunolocalization*. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1086 - 1095.
- Duprez, D.; Van Helshoecht, P.; Van den Eynd, W. y Leeman, M. (2002) *Prevalence of hypertension in the adult population of Belgium: Report of a worksite study: Attention hypertension*. *J. Hum. Hypertens.* 16: 47 - 52.
- Ebeling, W.; Hennrich, N.; Klockow, M.; Metz, H.; Orth, H. D. y Lang, H. (1974) *Proteinase K from Tritirachium album Limber*. *Eur. J. Biochem.* 47: 91 - 97.
- Eisendrath, S. y Lichtmacher, J. (2006) *Trastornos psiquiátricos. Delirio, demencia y otros trastornos cognitivos*. En: *Diagnóstico clínico y tratamiento*. (Eds.: Tierney, L.; McPhee, S. y Papadakis, M.). 41ª edición. Editorial El Manual Moderno, México 955 - 956.
- Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V. Jr. y Feather-Stone, R. M. (1961) *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88 - 95.
- Erdös, E. G. (1975) *Angiotensin I-converting enzyme*. *Circ. Res.* 36: 247 - 255.
- Erdös, E. G. (1976) *Conversion of angiotensin I to angiotensin II*. *Am. J. Med.* 60: 749 - 759.
- Fahmi, A.; Morimura, S.; Guo, H. C.; Shigematsu, T.; Kida, K. y Uemura, Y. (2004) *Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales*. *Process Biochem.* 39(10): 1195 - 1200.
- FAO/OMS. World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nation. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Technical report. Microbiological risk assessment series 5. Rome, Italy. 2004. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/y5394e/y5394e.pdf>



- Ferreira, S. H.; Bartet, D. C. y Greene, L. J. (1970) *Isolation of Bradykinin-potentiating peptides from Bothrops jararaca venom*. *Biochemistry*. 9: 2583 - 2593.
- Fiat, A. M.; Migliore-Samour, D.; Jolles, P.; Drouet, L.; Bal dit Sollier, C. y Caen, J. (1993) *Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities*. *J. Dairy Sci.* 76: 301 - 310.
- Filho, J.; Medeiros, K.; Diniz, M.; Batista, L.; Athayde-Filho, P. y Silva, M. (2006) *Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase*. *Rev. Bras. Pharmacogn.* 16: 258 - 285.
- Firon, N.; Ashkenazi, S.; Mirelman, D.; Ofek, I. y Sharon, N. (1987) *Aromatic alpha-glycosides of mannose are powerful inhibitors of the adherence of type 1 fimbriated Escherichia coli to yeast and intestinal epithelial cells*. *Infect. Immun.* 55: 472 - 476.
- FitzGerald, R. J. y Meisel, H. (2000) *Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme*. *Brit. J. Nutr.* 84: 33 - 37.
- FitzGerald, R. J. y Meisel, H. (1999) *Lactokinins: whey protein-derived ACE inhibitory peptides*. *Nahrung*. 43(3): 165 - 167.
- Fleet, G. H. y Manners, D. J. (1977) *The enzymic degradation of an alkali-soluble glucan from the cell walls of Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 98: 315 - 327.
- Flint Beal, M.; Richardson, E. y Martin, J. (1998) *Enfermedad de Alzheimer y demencias afines*. En: *Harrison T.R. Principios de medicina interna*. 14ª edición. Editorial Interamericana Mc Graw-Hill, México, vol. II: 2613 - 2616.
- Fosset, S. y Tomé, D. (2001) *Biological activities of milk peptides*. *Cah. Agr.* 10: 299 - 305.
- Fox, P. F. y Flynn, A. (1994) *Biological properties of milk proteins*. En *Dairy Products in Human Health and Nutrition*. (Eds: Serrano Ríos y col.). Bolkema, Rotterdam, pp. 97 - 111.
- Freeze, H. H. (2001) *Special considerations for glycoproteins and their purification*. *Curr. Prot. Mol. Biol.* Chapter 17, Unit 17.1.

- Fruton, J. S. (1971) *Pepsin*. En: *Enzymes*. (Ed. Boyer, P.D.). Academic Press, New York, EE.UU. Vol. 3, pp. 120 - 164.
- Fuglsang, A.; Rattray, F. P.; Nilsson, D. y Nyborg, N. C. B. (2003) *Lactic acid bacteria: Inhibition of angiotensin converting enzyme in vitro and in vivo*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 83: 27 - 34.
- Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J. y Klenk, D. C. (1985) *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal. Biochem*. 150: 76 - 85.
- Fujita, H.; Yokoyama, K. y Yoshikawa, M. (2000) *Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins*. *J. Food Sci*. 65: 564 - 569.
- Gagnaire, V.; Molle, D.; Herrouin, M. y Leonil, J. (2001) *Peptides identified during Emmental cheese ripening: Origin and proteolytic systems involved*. *J. Agric. Food Chem*. 49: 4402 - 4413.
- Gañan, M.; Carrascosa, A. V.; de Pascual-Teresa, S. y Martínez-Rodríguez, A. J. (2009) *Inhibition by yeast-derived mannoproteins of adherence to and invasion of Caco-2 cells by Campylobacter jejuni*. *J. Food Prot*. 72: 55 - 59.
- Gañan, M.; Martínez-Rodríguez, A. J. y Carrascosa, A. V. (2007) *Manoproteínas de levadura y su aplicación en la industria cárnica*. *Eurocarne* 155: 119 - 124.
- Ganzazade, A.; Sklyar, A.; Nasibov, S.; Sushkov, I.; Shashkov, A. y Knirel, Y. (1997) *Structural features of sulphated chitosans*. *Carbohydr. Polym*. 34: 113 - 116.
- Giacobini, E. (2004) *Cholinesterase inhibitor: new role and therapeutic alternatives*. *Pharmacol. Res*. 50: 433 - 440.
- Gilbert, C.; Atlan, D.; Blanc, B.; Portailer, R.; Germond, J.; Lapierre, L. y Mollet, B. (1996). *A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the prtB gene from Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus*. *J. Bacteriol*. 178: 3059 - 3065.
- Global Foodborne Infections Network (GFN) Strategic Plan 2011-2015.WHO [http://www.who.int/gfn/publications/gfn\\_strategic\\_plan\\_2011-2015.pdf](http://www.who.int/gfn/publications/gfn_strategic_plan_2011-2015.pdf)
- Gobbetti, M.; Ferranti, P.; Smacchi, E.; Goffredi, F. y Addeo, F. (2000) *Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented*

*milks started by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus SS1 and Lactococcus lactis subsp. cremoris FT4.* Appl. Environ. Microb. 66: 3898 - 3904.

Gobbetti, M.; Minervini, F. y Rizzelo, C. G. (2004) *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antimicrobial bioactive peptides.* Int. J. Dairy Technol. 57: 173 - 188.

Gobbetti, M.; Stepaniak, L.; De Angelis, M.; Corsetti, A. y Di Cagno, R. (2002) *Latent bioactive peptides in milk proteins: Proteolytic activation and significance in dairy processing.* Cri. Rev. Food Sci. Nutr. 42: 223 - 239.

Gómez-Guillén, M. C.; López-Caballero, M. E.; Alemán, A.; López de Lacey, A.; Giménez, B. y Montero, P. (2010) *Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin.* En: Sea By-Products as Real Material: New Ways of Application. (Ed: Estelle Le Bihan). Transworld Research Network, Trivandrum, India, pp. 89 - 115.

Gómez-Pinilla, F. (2008) *Brain foods: the effects of nutrients on brain function.* Nat. Rev. Neurosci. 9: 568 - 578.

Gonçalves, F.; Heyraud, A.; de Pinho, M. N., y Rinaudo, M. (2002) *Characterization of white wine mannoproteins.* J. Agric. Food Chem. 50: 6097 - 6101.

Gorbach, S. L. (2000) *Probiotics and gastrointestinal health.* Am. J. Gastroenterol. 95: 2 - 4.

Ha, C. H.; Lim, K. H.; Kim, Y. T.; Lim, S. T.; Kim, C. W. y Chang, H. I. (2002) *Analysis of alkali-soluble glucan produced by Saccharomyces cerevisiae wild-type and mutants.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 58: 370 - 377.

Hamme, V.; Sannier, F.; Piot, J. M.; Didelot, S. y Bordenave-Juchereau, S. (2009) *Crude goat whey fermentation by Kluyveromyces marxianus and Lactobacillus rhamnosus: contribution to proteolysis and ACE inhibitory activity.* J. Dairy Res. 76: 152 - 157.

Haque, E. y Chand, R. (2008) *Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins.* Eur. Food Res. Technol. 227: 7 - 15.

- Hardy, M. R. y Townsend R. R. (1994) *High-pH anion-exchange chromatography of glycoprotein-derived carbohydrates*. Methods Enzymol. 230: 208 - 225.
- Harris, E. L. V. y Angal, S. (1989) *Protein purification methods: a practical approach*. (Eds: Harris, E. L. V. y Angal, S.). En: Practical Approach Series. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, England. pp 317.
- Hartmann, R. y Meisel, H. (2007) *Food-derived with biological activity: from research to food application*. Curr. Opin. Biotech. 18: 163 - 169.
- Havlis, J.; Thomas, H.; Sebela, M. y Shevchenko, A. (2003) *Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins*. Anal. Chem. 75(6): 1300 - 1306.
- Hayakari, M.; Kondo, Y. y Izumi, H. (1978) *A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme*. Anal. Biochem. 84: 361 - 369.
- Hayes, M.; Ross, R. P. Fitzgerald, G. F.; Hill, C. y Stanton, C. (2006) *Casein-derived antimicrobial peptides generated by Lactobacillus acidophilus DPC6026*. Appl. Environ. Microbiol. 72: 2260 - 2264.
- Hayes, M.; Ross, R. P.; Fitzgerald, G. F. y Stanton, C. (2007) *Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part I: Overview*. Biotechnol. J. 2: 426 - 434.
- Heinisch, J. J. y Hollenberg, C. P. (1993) *Yeast*. En: *Biotechnology* (Eds: Rehm, H. J. y Reed, G.). New York, Basel, Cambridge, Tokyo. pp. 470 - 503.
- Hermansen, K. (2000) *Diet, blood pressure and hypertension*. Brit. J. Nutr. 83: 113 - 119.
- Hernández-Ledesma, B.; Miralles, B.; Amigo, L.; Ramos, M. y Recio, I. (2005) *Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk*. J. Sci. Food Agric. 85: 1041 - 1048.
- Hernández-Ledesma, B.; Recio, I.; Ramos, M. y Amigo L. (2002) *Preparation of ovine and caprine  $\alpha$ -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin*. Int. Dairy J. 12: 805 - 812.
- Herregods, G.; van Camp, J.; Morel N.; Ghesquière, B.; Gevaert, K.; Vercruyse, L.; Dierckx, S.; Quanten, E. y Smagghe, G. (2011) *Angiotensin*

- I-converting enzyme inhibitory activity of gelatin hydrolysates and identification of bioactive peptides.* J. Agric. Food Chem. 59(2): 552 - 558.
- Hill, R. D.; Lahov, E. y Givol, D. (1974) *A rennin-sensitive bond in alpha and beta casein.* J. Dairy Res. 41: 147 - 153.
- Hooge, D. M. (2004) *Meta-analysis of Broiler Chicken Pen Trials Evaluating.* Int. J. Poult. Sci. 3: 163 - 174.
- Huang, C.; Nong, S. H.; Mansour, M. K.; Specht, C. A. y Levitz, S. M. (2002) *Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from Cryptococcus neoformans that stimulates T-cell responses.* Infect. Immun. 70: 5485 - 5493.
- Ishihara, N.; Chu, D. C.; Akachi, S.; y Juneja, L. R. (2000) *Preventive effect of partially hydrolyzed guar gum in infection of Salmonella enteritidis in young and laying hens.* Poult. Sci. 78: 689 - 697.
- Israaili, Z. H. y Hall, W. D. (1992) *Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin converting enzyme inhibitor therapy: A review of the literature and pathophysiology.* Annu. Int. Med. 117: 234 - 242.
- Jamroz, D.; Wiliczekiewicz, A.; Orda, J.; Wertelecki, T. y Skorupinska, J. (2004) *Response of broiler chickens to the diets supplemented with feeding antibiotic or mannanoligosaccharides.* Electro. J. Polish Agric. Univ. 7: 1 - 6.
- Jang, J. H. y Lee, J. S. (2011) *Antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant activity of Vitis hybrid-Vitis coignetiae red wine made with Saccharomyces cerevisiae.* Mycobiology 39: 137 - 139.
- Jeger, R. V. (2013) *Mens sana in corpore sano revisited.* Eur. Heart J. (2013) 34: 2580 - 2581.
- Jelinek, C. F.; Pohland, A. E. y Wood, G. E. (1989) *Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds - an update.* J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72: 223 - 230.
- Jollès, P.; Levy-Toledano, S.; Fiat, A. M.; Soria, C.; Gillensen, D.; Thomaidis, A.; Dunn, F. W. y Caen, J. P. (1986) *Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from  $\beta$ -casein on platelet function.* Eur. J. Bioch. 158: 379 - 382.

- Jones, F. S. y Simms, H. S. (1930) *The bacterial growth inhibitor (lactenin) of milk*. J. Exp. Med. 51: 327 - 339.
- Juillard, V.; Laan, H.; Kunji, E.; Jeronimus-Stratingh, C.; Bruins, A. y Konings, W. (1995) *The extracellular PI-type proteinase of Lactococcus lactis hydrolyzes beta-casein into more than one hundred different oligopeptides*. J. Bacteriol. 177: 3472 - 3478.
- Jung, W. K.; Mendis, E.; Je J. Y. Park, P. J.; Son B. W.; Kim, H. C.; Choi, Y. K. y Kim, S. K. (2006) *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (Limanda aspera) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats*. Food Chem. 94(1): 26 - 32.
- Kafurke, U.; Erijman, A.; Aizner, Y.; Shifman, J. M. y Eichlera, J. (2015) *Synthetic peptides mimicking the binding site of human acetylcholinesterase for its inhibitor fasciculin 2*. J. Pept. Sci. 21(9): 723 - 730.
- Kanauchi, O.; Igarashi, K.; Ogata, R.; Mitsuyama, K. y Andoh, A. (2005) *A yeast extract high in bioactive peptides has a blood-pressure lowering effect in hypertensive model*. Curr. Med. Chem. 12: 3085 - 3090.
- Kang, J. H.; Lee, M. K.; Kim, K. L. y Hahm, K. S. (1996) *Structure-biological activity relationship of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin*. Int. J. Pept. Res. 48: 357 - 363.
- Kannan, A.; Hettiarachchy, N. S. y Mahedevan, M. (2012) *Peptides derived from rice bran protects cells from obesity and Alzheimer's disease*. Int. J. Biomed. Res. 3: 131 - 135.
- Kannel, W. B. (1996) *Blood pressure as a cardiovascular risk factor*. J. Am. Med. Assoc. 275: 1571 - 1576.
- Kantor, D. (2007) *Enfermedad de Alzheimer*. Review provided by VeriMed Healthcare NetYork. Medline plus enciclopedia médica. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000760.htm>

- Karlsson, E.; Mbugua, P. M. y Rodriguez-Itthurralde, D. (1984) *Fasciculins, anticholinesterase toxins from the venom of the green mamba Dendroaspis angusticeps*. J. Physiol. (Paris). 79: 232 - 240.
- Kasa, P. Rakonczay, Z. y Gulya, K. (1997) *The cholinergic system in Alzheimer's disease*. Prog. Neurobiol. 52: 511 - 535.
- Kawase, M.; Hashimoto, H.; Hosoda, M.; Morita, H. y Hosono, A. (2000) *Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure*. J. Dairy Sci. 83: 255 - 263.
- Kayser, H. y Meisel, H. (1996) *Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptide derived from bovine milk proteins*. FEBS Letters. 383: 18 - 20.
- Keane, S. y Ryan, M. F. (1999) *Purification, characterization, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the wax moth, Galleria Mellonella*. Insect Biochem. Molec. 29: 1097 - 1104.
- Kearney, P. M.; Whelton, M.; Reynolds, K.; Muntner, P. y He, J. (2005) *Global burden of hypertension: Analysis of worldwide data*. The Lancet. 365: 217 - 223.
- Kettl, P. (2007) *Helping families with end-of-life care in Alzheimer's disease*. J Clin Psychiatry. 68(3): 428 - 429.
- Kim, J. H., Lee, D. H.; Jeong, S. C.; Chung, K. S. y Lee J. S. (2004) *Characterization of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from Saccharomyces cerevisiae*. J. Microbiol. Biotechnol. 14(6): 1318 - 1323.
- Kim, S. K.; Byun, H. G.; Park, P. J. y Shahidi, F. (2001) *Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate*. J. Agr. Food Chem. 49: 2992 - 2997.
- Kim, Y. K. y Chung, B. H. (1999) *A novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from human  $\alpha$ 1-casein*. Biotechnol. Lett. 21: 575 - 578.
- Kitts, D. D. y Weiler, K. (2003) *Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery*. Curr. Pharm. Des. 9: 1309 - 1323.
- Klis, F. M. (1994) *Review: Cell wall assembly in Yeast*. Yeast. 10: 851 - 869.

- Klis, F. M. Hellingwerf, K. y Brul, S. (2002) *Dynamics of the cell wall structure in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol. Biol. Rev. 26: 239 - 256.
- Kohama, Y.; Matsumoto, S.; Oka, H.; Terramoto, T.; Okabe, M. y Mimura, T. (1988) *Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle*. Bioche. Bioph. Res. Co. 155: 332 - 337.
- Kohama, Y.; Oka, H.; Kayamori, Y.; Tsujikawa, K.; Mimura, T.; Nagase, Y. y Satake, M. (1991) *Potent synthetic analogues of angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from tuna muscle*. Agr. Biol. Chem. 55: 2169 - 2170.
- Kohama, Y.; Nagase, Y.; Oka, H.; Nakagawa, T.; Teramoto, T.; Murayama, N.; Tsujibo, H.; Inamori, Y. y Mimura, T. (1990) *Production of angiotensin-converting enzyme inhibitors from baker's yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. J Pharmacobiodyn. 13(12): 766 - 771.
- Kohmura, M.; Nio, N.; Kubo, K.; Minoshima, Y.; Munekata, E. y Ariyoshi, Y. (1989) *Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human b-casein*. Agric. Biol. Chem. 53: 2107 - 2114.
- Korhonen, H. J. (2009) *Milk-derived bioactive peptides: From science to applications*. J. Funct. Foods. 1: 177 - 187.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2003) *Food-derived bioactive peptides opportunities for designing future foods*. Curr. Pharm. Design. 9: 1297 - 1308.
- Korhonen, H. y Pihlanto-Lepälä, A. (2006) *Bioactive peptides: Production and functionality*. Int. Dairy J. 16: 945 - 960.
- Kost, N. V.; Sokolov, O. Y.; Kurasova, O. B.; Dimitrev, A. D.; Tarakanova, J. N., Gabaeva, M. V.; Zolotarev, Y. A.; Dadoyan, A. K.; Grachev, S. A.; Korneeva, E. V.; Mikheeva, I. G. y Zozulya, A. A. (2009)  *$\beta$ -casamorphin 7 in infants on different type of feeding and different levels of psychomotor development*. Peptides. 30: 1854 - 1860.
- Koutsopoulos, S.; Patzsch, K.; Bosker, W. y Norde, W. (2007) *Adsorption of trypsin on hydrophilic and hydrophobic surfaces*. Langmuir. 23: 2000.
- Kraut, D.; Goff, H.; Pai, R. K.; Hosea, N. A.; Silman, I.; Sussman, J. J.; Taylor, P. y Voet, J. G. (2000) *Inactivation studies of acetylcholinesterase with phenylmethylsulfonyl fluoride*. Mol. Pharmacol. 57: 1243 - 1248.



- Kunji, E. R.; Mierau I.; Hagting, A.; Poolman, B.; y Konings, W. N. (1996) *The proteolytic systems of lactic acid bacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70: 187 - 221.
- Kuwabara, Y.; Nagai, S.; Yoshimitsu, N.; Nakagawa, I.; Watanabe, Y. y Tamai, Y. (1995) *Antihypertensive effect of the milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast*. *J. Ferment. Bioeng.* 80: 294 - 295.
- Laemmli, U. K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*. 227 (5259): 680 - 685.
- Laffan, R. J.; Goldberg, M. E.; High, J. P.; Schaffer, T. R.; Waugh, M. H. y Rubin, B. (1978) *Antihypertensive activity in rats of SQ 14,225, an orally active inhibitor of angiotensin I converting enzyme*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 204: 281 - 288.
- Lahov, E. y Regelson, W. (1996) *Antibacterial and stimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides*. *J. Food Chem. Toxicol.* 34: 131 - 145.
- Lahov, E.; Edelsten, D.; Sode-Morgensen, M. T. y Sofer, E. (1971) *Properties of basic glycopeptides released from cow milk protein by heat*. *Milchwissenschaft*. 26: 489 - 495.
- Laloi, P.; Atlan, D.; Blanc, B.; Gilbert, C. y Portalier, R. (1991) *Cell-wall-associated proteinase of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus CNRZ 397: differential extraction, purification and properties the enzyme*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 196 - 204.
- LeBlanc, A. D.; Matar, C.; LeBlanc, N. y Perdigon, G. (2005) *Effects of milk fermented by Lactobacillus helveticus R389 on a murine breast cancer model*. *Breast Cancer Res.* 7: 477 - 486.
- LeBlanc, J. G.; Matar, C.; Valdéz, J. C.; Leblanc, J. y Perdigón, G. (2002) *Immunomodulatory effects of peptidic fractions issued from milk fermented with Lactobacillus helveticus*. *J. Dairy Sci.* 85: 2733 - 2742.
- Leclerc, P. L.; Gauthier, S. F.; Bachelard, H.; Santure, M. y Roy, D. (2002) *Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by Lactobacillus helveticus*. *Int. Dairy J.* 12: 995 - 1004.

- Leroy, F. y De Vuyst, L. (2004) *Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry*. Trends Food Sci. Tech. 15: 67 - 78.
- Lesage, G. y Bussey, H. (2006) *Cell wall assembly in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Molec. Biol. Rev. 70: 317 - 343.
- Li, G. H.; Le, G. W.; Shi, Y. H. y Shrestha, S. (2004) *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects*. Nutr. Res. 24: 469 - 486.
- Liepke, C.; Zucht, H. D.; Forsmann, W. G. y Standker, L. (2001) *Purification of novel peptide antibiotics from human milk*. J. Chromatogr. 752: 369 - 377.
- Line, E. J.; Bailey, J. S.; Cox, N. A.; Stern, y Tompkins, T. (1998) *Effect of yeast supplemented feed on Salmonella and Campylobacter populations in broilers*. Poult. Sci. 77: 405 - 410.
- Lipke, P. y Ovalle, R. (1998) *Cell Wall architecture in yeast: New structure and new challenges*. J. Bacteriol. 180: 3735 - 3740.
- Liu, L.; Wang, L.; Cheng, Y.; Saito, M.; Yamaki, K.; Qiao, Z. y Li, L. (2009) *Isoflavone content and anti-acetylcholinesterase activity in commercial Douchi (a traditional Chinese salt-fermented soybean food)*. JARQ. 43: 301 - 307.
- Liu, Z. Y.; Dong, S. Y.; Xu, J.; Zeng, M. Y.; Song, H. X. y Zhao, Y. H. (2008) *Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (Crassostrea gigas) with alcalase and bromelin*. Food Control. 19: 231 - 235.
- Lönnerdal, B. (2004) *Human milk proteins. Key components for the biological activity of human milk*. Adv. Exp. Med. Biol. 554: 11 - 25.
- López, A. D. y Murray, C. C. (1998) *The global burden of disease, 1990 -2020*. Nat. Med. 4: 1241 - 1243.
- López-Expósito, I. y Recio, I. (2006) *Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins*. Int. Dairy J. 16: 1294 - 1305.
- Lorenzen, P. C. y Meisel, H. (2005) *Influence of trypsin action in yoghurt milk on the release of caseinophosphopeptide-rich fractions and physical properties of the fermented products*. Int. J. Dairy Technol. 58: 119 - 124.

- Loukas, S.; Varaucha, D.; Zioudrou, C.; Streaty, R. A. y Klee, W. A. (1983) *Opioid activities and structures of alpha-casein-derived exorphins*. *Biochemistry*. 22: 4567 - 4573.
- Luchsinger, J. A. (2004) *Dietary factors and Alzheimer's disease*. *Lancet Neurol*. 3(10): 579 - 87.
- Mahendra, N. (2004) *Exercise and behavioural management training improves physical health and reduces depression in people with Alzheimer's disease*. *Evidence-based Healthcare*. 8(2): 77 - 79.
- Malkoski, M.; Dashper, S. G.; O'Brien-Simpson, N. M.; Talbo, G. H.; Macris, M. y Cross, K. J. (2001) *Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 45: 2309 - 2315.
- Mallender, W. D.; Szegletes, T. y Rosenberry, T. L. (1999) *Organophosphorylation of acetylcholinesterase in the Presence of Peripheral Site Ligands: distinct effects of propodium and fasciculin*. *J. Biol. Chem*. 274, 8491 - 8499.
- Marriott, B. (2000) *Functional foods: an ecologic perspective*. *Am. J. Clin. Nutr*. 71(6): 1728 - 1734.
- Martínez-Rodríguez, A. J.; Núñez Y. P. y Carrascosa A. V. (2009) *Seguridad del vino: manoproteínas y ocratoxina A*. *Acenología*. [http://www.acenologia.com/correspondencia/seguridad\\_vino\\_manoproteinas\\_cor0709.htm](http://www.acenologia.com/correspondencia/seguridad_vino_manoproteinas_cor0709.htm).
- Maruyama, S.; Mitachi, H.; Tanaka, H.; Tomizuka, N. y Suzuki, H. (1987) *Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein*. *Agric. Biol. Chem*. 51: 1581 - 1586.
- Matar, C.; LeBlanc, J. G.; Martin, L. y Perdigon, G. (2003) *Biologically active peptides released in fermented milk: role and functions*. En: *Handbook of Fermented Functional Foods*. (Ed: Farnworth, E. R.) Boca Raton: CRC Press Inc. p. 177 - 199.
- Matsufuji, H.; Matsui, T.; Seki, E.; Osajima, K.; Nakashima, M. y Osajima, Y. (1994) *Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline*

*protease hydrolysate derived from sardine muscle*. Biosci. Biotech. Bioch. 58: 2244 - 2245.

Matsumura, N.; Fujii, M.; Takeda, Y.; Sugita, K. y Shimizu, T. (1993) *Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels*. Biosci. Biotech. Bioche. 57: 1743 - 1744.

Mazoyer, E.; Lévy-Toledano, S.; Rendu, F.; Hermant, L.; Lu, H.; Fiat, A. M.; Jollès, P. y Caen, J. (1990) *KRDS, a new peptide derived from human lactotransferrin, inhibits platelet aggregation and release reaction*. Eur. J. Bioch. 194: 43 - 49.

McCann, K. B.; Shiell, B. J.; Michalski, W. P.; Lee, A.; Wan, J.; Raginski, H. y Coventry, M. J. (2005) *Insolation of Characterization of antibacterial peptides derived from the f(164-207) región of bovine  $\alpha$ 2-casein*. Int. Dairy J, 15: 133 - 143.

Meisel, E. (1993) *Diagnosis and clinical aspects of supraventricular tachycardia*. Z Gesamte Innate Medicine. 48(9): 414 - 424.

Meisel, H. (1998) *Overview on milk protein-derived peptides*. Int. Dairy J. 8: 363 - 373.

Meisel, H. (2004) *Multifunctional peptides encrypted in milk proteins*. Biofactors. 21: 55 - 61.

Meisel, H. y Fitzgerald, R. J. (2003) *Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects*. Curr. Pharm. Design. 9: 1289 - 1295.

Mihatsch, W. A.; Franz, A. R.; Kuhnt, B.; Högel, J. y Pohlandt, F. (2005) *Hydrolysis of casein accelerates gastrointestinal transit via reduction of opioid receptor agonist released from casein in rats*. Biol. Neonate. 87: 160 - 163.

Mine, Y.; Ma, F. P. y Lauriau, S. (2004) *Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme*. J. Agric. Food Chem. 52: 1088 - 1094.

Minervini, F.; Algaron, F.; Rizzello, C. G. Fox, P. F.; Monnet, V. y Gobbetti, M. (2003) *Angiotensin I-convertingenzyme-inhibitory and antibacterial peptides from Lactobacillus helveticus PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species*. Appl. Environ. Microbiol. 6: 5297 - 5305.

- Mirelman, D.; Altman, G. y Eshdat, Y. (1980) *Screening of bacterial isolates for mannose-specific lectin activity by agglutination of yeast*. J. Clin. Microbiol. 11: 328 - 331.
- Mkrtchyan, H.; Gibbons, S.; Heidelberger, S.; Zloh, M.; Limaki, H. K. (2010) *Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by Lactobacillus acidophilus n.v. Er 317/402 strain Narine*. Int. J. Antimicrob. Agents. 35: 255 - 260.
- Moruno, E. G.; Sanlorenzo, C.; Boccaccino, B. y Di Stefano, R. (2005) *Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine*. Am J. Enol Vitic. 56: 73 - 76.
- Muguerza, B.; Ramos, M.; Sánchez, E.; Manso, M. A.; Miguel, M.; Aleixandre, A.; Delgado, M. A. y Recio, I. (2006) *Antihypertensive activity of milk fermented by Enterococcus faecalis strains isolated from raw milk*. Int. Dairy J. 16: 61 - 69.
- Mukherjee, P. K.; Kumar, V.; Mal, M. y Houghton, P. J. (2007) *Acetylcholinesterase inhibitors from plants*. Phytomedicine, 14(4): 289 - 300.
- Mullally, M. M.; Meisel, H. y FitzGerald, R. J. (1996) *Synthetic peptides corresponding to  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity*. Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 377: 259 - 260.
- Murphy, J. G. (2007) *Mayo clinic Cardiology. Concise Textbook. Third Edition*. (EDs: Murphy, J. G. y Lloyd, M. A.). Mayo Clinic Scientific Press and Informa Healthcare USA, INC.
- Nakamura, Y.; Yamamoto, N.; Sakai, K.; Okubo, A.; Yamazaki, S. y Takano, T. (1995) *Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk*. J. Dairy Sci. 78: 777 - 783.
- Nakashima, Y.; Arihara, K.; Mio, H. y Itoh, M. (2002) *Antihypertensive activities of peptides derived from porcine skeletal muscle myosin in spontaneously hypertensive rats*. J. Food Sci. 67: 434 - 437.
- Naughton, P. J.; Mikkelsen, L. L. y Jensen, B. B. (2001) *Effect of nondigestible oligosaccharides or Salmonella enterica serovar typhimurium and non-*

- pathogenic Escherichia coli in the pig small intestine in vitro*. Appl. Environ. Microbiol. 67(8): 3391 - 3395.
- Ng-Kwai-Hang, K. F. y Vane, J. R. (1970) *Some properties of angiotensin converting enzyme in the lung in vivo*. Nature. 225: 1142 - 1144.
- Nguyen, T.; Fleet, G. y Rogers, P. (1998) *Composition of the cell walls of several yeast species*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 206 - 212.
- Ni, H.; Li, L.; Guo, S. S.; Li, H. H.; Jiang, R. y Hu, S. Q. (2012) *Isolation and identification of an angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide from yeast [Saccharomyces cerevisiae]*. Curr. Anal. Chem. 8(1): 180 - 185.
- Nielsen, P. M.; Petersen, D. y Dambmann, C. (2001) *Improved method for determining food protein degree of hydrolysis*. J. Food Sci. 66: 642 - 646.
- Núñez, Y. P.; Carrascosa, A. V.; González, R.; Polo, M. C. y Martínez-Rodríguez, A. J. (2006) *Isolation and characterization of a thermally extracted yeast cell wall fraction potentially useful for improving the foaming properties of sparkling wines*. J. Agric. Food Chem. 54: 7898 - 7903.
- Okello, E. J.; Savelev, S. U. y Perry, E. K. (2004) *In vitro anti- $\beta$ -secretase and dual anti-cholinesterase activities of Camellia sinenses L. (tea) relevant to treatment of dementia*. Phytother. Res. 18: 624 - 627.
- Ondetti, M. A. y Cushman, D. W. (1982) *Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors*. Ann. Rev. Biochem. 51: 283 - 308.
- Ondetti, M. A.; Williams, N. J.; Sabo, E. F.; Pluscec, J.; Weaver, E. R. y Kocy, O. (1971) *Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of Bothrops jararaca. Isolation, elucidation of structure and synthesis*. Biochemistry. 10: 4033 - 4039.
- Opie, L. H. (1996) *ACE inhibitors in pregnancy- how to avoid the sting in the tail*. South African Med. J. 86: 326 - 327.
- Ortiz, J. E.; Berkov, S.; Pigni, N. B.; Theoduloz, C.; Roitman, G.; Tapia, A.; Bastida, J. y Feresin, G. E. (2012) *Wild Argentinian Amaryllidaceae, a new renewable source of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine and other alkaloids*. Molecules. 17: 13473 - 13482.

- Osajima, K.; Nakashima, M. y Osajima, Y. (1994) *Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolysate derived from sardine muscle*. *Biosci. Biotech. Bioche.* 58: 2244 - 2245.
- Panitee, T. y Vanee, C. (2007) *Antibacterial activities of thymol, eugenol and nisin against some food spoilage bacteria*. *Nat. Sci.* 41: 319 - 323.
- Peat, S.; Whelan, W. J. y Edwards, T. E. (1961). *Polysaccharides of baker's yeast. Part IV. Mannan*. *J. Chem. Soc. (London)*: 28 - 35.
- Pellegrini, A. (2003) *Antimicrobial peptides from food proteins*. *Curr. Pharm. Des.* 9: 1225 - 1238.
- Pellegrini, A.; Dettling, C.; Thomas, U. y Hunziker, P. (2001) *Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine  $\beta$ -lactoglobulin*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1526: 131 - 140.
- Pellegrini, A.; Hülsmeier, A. J.; Hunziker, P. y Thomas, U. (2004) *Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1672: 76 - 85.
- Perica, M. M. y Delas, I. (2011) *Essential fatty acids and psychiatric disorders*. *Nutr. Clin. Pract.* 26: 409 - 425.
- Pfohl-Leszkowicz, A. (2000) *Risques mycotoxiques pour la santé des animaux et de l'homme*. *Cah Nutr Diétics* 35: 389 - 97.
- Phelan, M y Kenns, D. (2011) *The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease*. *Food Funct.* 2: 153 - 167.
- Pihlanto-Leppälä, A.; Koskinen, P.; Piilola, K.; Tupasela, T. y Korhonen, H. (2000) *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides*. *J. Dairy Res.* 67: 53 - 64.
- Pihlanto-Leppälä, A.; Rokka, T. y Korhonen, H. (1998) *Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from bovine milk proteins*. *Int. Dairy J.* 8: 325 - 331.
- Pinto, G.; Simonetta, C.; Cuollo, M.; Lilla, S.; Chianese, L. y Addeo, F. (2012) *Bioactive Casein Phosphopeptides in Dairy Products as Nutraceuticals for Functional Foods*. En: *Milk protein*. (Ed: Hurley, W. L.). InTech. Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia. pp. 6.

- Price, D. L. (1986) *New perspectives on Alzheimer's disease*. Ann. Rev. Neurosci. 9: 489 - 512.
- Pulok, K. M.; Venkatesan, K.; Mainak, M. y Houghton, P. J. (2007) *Acetylcholinesterase inhibitors from plants*. Phytomedicine. 14: 289 - 300.
- Quirós, A.; Ramos, M.; Muguerza, B.; Delgado, M. A.; Miguel, M.; Aleixandre, A. y Recio, I. (2007) *Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with Enterococcus faecalis*. Int. Dairy J. 17: 33 - 41.
- Rafiquzzaman, S. M.; Kim, E. Y.; Lee, J. M.; Md Mohibbullah; Md Badrul Alam; Moon, I. S.; Kim, J. M. y Kong, I. S. (2015) *Anti-Alzheimers and anti-inflammatory activities of a glycoprotein purified from the edible brown alga Undaria pinnatifida*. Food Res. Int. 77: 18 - 124.
- Raghavan, S. y Kristinsson, H. G. (2009) *ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates*. Food Chem. 117(4): 582 - 588.
- Rajanbabu, V. y Chen, J. Y. (2011) *Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future*. Peptides. 32: 415 - 420.
- Ramchandran, L. y Shah, N. P. (2008) *Proteolytic profiles and angiotensin-I converting enzyme and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of selected lactic acid bacteria*. J. Food Sci. 73: 75 - 81.
- Recio, I. y López-Fandiño, R. (2005) *Ingredientes y productos lácteos funcionales: bases científicas de sus efectos en la salud*. En: *Alimentos Funcionales*. Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología, Madrid, España, pp. 23 - 100.
- Recio, I. y Visser, S. (1999) *Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine alpha(s2)-casein*. Biochim. Biophys. Acta 1428: 314 - 326.
- Rhee, I. K.; Van de Meent, M.; Ingkaninan, K. y Verpoorte, R. (2001) *Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bio-activity staining*. J. Chromatogr A. 915: 217 - 223.
- Ringot, D.; Lerzy, B.; Bonhoure, J. P.; Auclair, E.; Oriol, E. y Larondelle, Y. (2005) *Effect of temperature on in vitro ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives*. Process Biochem. 40: 3008 - 3016.



- Riordan, J. F. (2003) *Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives*. *Genome Biol.* 4: 225.
- Roberfroid, M. B. (2000a) *Defining functional foods*. En: *Functional foods. Concept to product*. (Eds: Gibson G. R. y Williams, C. M.). CRC Press, Washinngton DC. pp. 9 - 25.
- Roberfroid, M. B. (2000b) *Prebiotics and probiotics: are they functional foods?*. *Am. J. Clin. Nutr.* 6: 1682 - 1687.
- Roberfroid, M. B. (2002) *Global view of functional foods: European perspectives*. *Br. J. Nutr.* 88(2): 133 - 138.
- Robert, P. R. y Zaloga, G. P. (1994) *Dietary bioactive peptides*. *New Horiz.* 2: 237 - 243.
- Rodríguez Silveira, M.; Monereo Megías, S. y Molina Baena, B. (2003) *Alimentos funcionales y nutrición óptima ¿Cerca o lejos?*. *Revista Española de Salud Pública.* 3: 317 - 331.
- Rodríguez, J. y Guerra Hernández, M. (2007) *Enfermedad de Alzheimer. Situación actual y estrategias terapéuticas*. *Revista Cubana de Medicina*. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S003475231999000200007&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S003475231999000200007&script=sci_arttext).
- Rokka, T.; Syvaaja, E. L.; Tuominen, J. y Korhonen, H. (1997) *Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of Lactobacillus GG fermented UHT milk*. *Milchwissenschaft*, 52: 675 - 677.
- Rutherford-Markwick, J. y Moughan, P. J. (2005) *Bioactive peptides derived from food*. *J. AOAC Int.* 88: 955 - 966.
- Saito, T. (2008) *Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 606: 295 - 317.
- Saito, T.; Abubakar, A.; Itoh, T.; Arai, I. y Aimar, M. V. (1997) *Development of a new type of fermented cheese whey beverage with inhibitory effects against angiotensin converting enzyme*. *Tohoku J. Agr. Res.* 48: 15 - 23.
- Santin, E.; Maiorka, A.; Macari, M.; Grecco, M.; Sanchez, J. C.; Okada, T. M. y Myasaka, A. M. (2001) *Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing Saccharomyces cerevisiae cell wall*. *J. Appl. Poult. Res.* 10: 236 - 244.

- Sasaki, M.; Bosman, B. y Wand Tan, P. S. T. (1995) *Comparison of proteolytic activities in various lactobacilli*. J. Dairy Res. 62: 601 - 610.
- Sasson, A. (1998) *Productos y procedimientos comerciales basados en organismos modificados genéticamente*. En: *Biotecnologías aplicadas a la producción de fármacos y vacunas* (Eds: Sasson, A.). Elfos Scientiae Editorial Latinoamericana, La Habana, pp. 21 - 26.
- Sato, H. y Feix, J. B. (2006) *Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides*. BBA Biomembranes. 1758: 1245 - 1256.
- Scallan, E.; Hoekstra, R. M.; Angulo, F.; Tauxe, R. V.; Widdowson, M. A.; Roy, S. L.; Jones, J. L. y Griffin, P. M. (2011) *Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens*. Emerg. Infect. Dis. 17: 7 - 15.
- Schägger, H. y von Jagow, G. (1987) *Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal. Biochem. 166: 368 - 379.
- Schillinger, U. y Lücke, F. K. (1989) *Antimicrobial activity of Lactobacillus sake isolated from meat*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1901 - 1906.
- Schlimme, E. y Meisel, H. (1995) *Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects*. Nahrung. 39: 1 - 20.
- Schoeni, J. C. L. y Wong, A. C. L. (1994) *Inhibition of Campylobacter jejuni colonization in chicks by defined competitive exclusion cultures*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1191 - 1197.
- Selhub, E. M.; Logan, A. C. y Bested, A. C. (2014) *Fermented foods, microbiota, and mental health: ancient practice meets nutritional psychiatry*. J. Physiol. Anthropol. 33: 1 - 12.
- Severin, S. y WenShui, X. (2005) *Milk biologically active components as nutraceuticals: Review*. Crit. Rev. Food Sci. 45: 645 - 656.
- Shah, N. P. (2000) *Effects of milk-derived bioactive: an overview*. Brit. J. Nutr. 84: 3 - 10.
- Sharma, S.; Sing, R. y Rana, S. (2011). *Bioactive peptides: a review*. Int. J. Bioautomation. 15: 223 - 250.

- Shebuski, R. J.; Berry, D. E.; Romoff, R.; Storer, B. L.; Ali, F. y Samanen, J. (1989) *Demonstration of Ac-Arg-Gly-Asp-Ser-NH<sub>2</sub> as an antiaggregatory agent in the dog by intracoronary administration*. *Thromb. Haemostasis*. 61: 183 - 188.
- Sienkiewicz-Szlapka, E.; Jarmolowska, B.; Krawczuk, S.; Kostyra, E.; Kostyra, H. y Bielikowicz, K. (2009) *Transport of bovine-milk-derived opioid peptides across Caco-2 monolayer*. *Int. Dairy J.* 19: 252 - 257.
- Silva, S. V. y Malcata, F. X. (2005) *Caseins as source of bioactive peptides*. *Int. Dairy J.* 15: 1 - 15.
- Sims, N. R.; Bowen, D. M.; Allen, S. J.; Smith, C. C. T.; Neary, D.; Thomas, D. J. y Davison, A. N. (1983) *Presynaptic cholinergic dysfunction in patients with dementia*. *J. Neurochem.* 40: 503 - 509.
- Singh, A. P. (2003) *The role of natural products in pharmacotherapy of Alzheimer disease*. *Ethnobotanical Leaflets*. 7: 1 - 5.
- Skeggs, L. T., Kahan, J. E. y Sumway, N. P. (1956) *The preparation and function of the angiotensin-converting enzyme*. *J. Exp. Med.* 103: 295 - 299.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goetze, N. M.; Olson B. J. y Klenk, D. C. (1985) *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal. Biochem.* 150: 76 - 85.
- So, L. Y Goldstein, I. J. (1968) *The interaction of Concanavalin A with R-mannans from a variety of microorganisms*. *J. Biol. Chem.* 243: 2003 - 2007.
- Soffer, R. L. (1976) *Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides*. *Ann. Rev. Biochem.*, 45: 73 - 94.
- Song, R.; Wei, R. B.; Luo, H. Y. y Wang, D. F. (2012) *Isolation and characterization of an antibacterial peptide fraction from the pepsin hydrolysate of halffin Anchovy (Setipinna taty)*. *Molecules*. 17: 2980 - 2991.
- Spring, P.; Wenk, C.; Dawson, K. A. y Newman, K. E. (2000) *The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella challenged broiler chicks*. *Poult. Sci.* 79: 205 - 211.

- Sramek, J. J.; Zarotsky, V. y Cutler, N. R. (2002) *Review of drug development and therapeutic role of cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease*. Drug Dev. Res. 56: 347 - 353.
- Steijns, J. M. y Hooijdonk, A. C. M. (2000) *Ocurrence structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin*. Brit. J. Nutr. 84: 511 - 517.
- Steiner, H.; Hultmark, D.; Engström, Å.; Bennich, H.; Boman, H. G. (1981) *Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity*. Nature. 292: 246 - 248.
- Sweeney, P. J. y Walker, J. M. (1993b) *Proteolytic enzymes for peptide production*. En: *Enzymes of Molecular Biology* (Ed.: Burrell, M. M.) Humana Press, Totowa, New Jersey, EE.UU. p. 277 - 303.
- Sweeney, P. J. y Walker, J. M. (1993a) *Proteinase K*. Methods Mol. Biol. 16: 305 - 311.
- Tagg, J. R. y Mc Given, A. R. (1971) *Assay systems for bacteriocins*. Appl. Environ. Microbiol. 21: 943 - 947.
- Taha, F. S.; Mohamed, S. S.; Wagdy, S. M. y Mohamed, G. F. (2013) *Antioxidant and Antimicrobial Activities of Enzymatic Hydrolysis Products from Sunflower Protein Isolate*. World Appl. Sci. J. 21: 651 - 658.
- Takano, T. (2002). *Anti-hypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptides*. Antonie van Leeuwenhoek. 82: 333 - 340.
- Tan, Y. N.; Matthews, K. R.; Di, R. y Ayob, M. K. (2012) *Bacteriostatic mode of action of trypsin-hydrolyzed palm kernel expeller peptide against Bacillus cereus*. Probiotics Antimicrob. Proteins. 4: 59 - 65.
- Tauzin, J.; Miclo, L. y Gaillard, J. L. (2002) *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine  $\alpha$ 2-casein*. FEBS Lett. 531: 369 - 374.
- Thomas, T. D. y Pritchard, G. G. (1987) *Proteolytic enzymes of dairy starter cultures*. FEMS Microbiol. Rev. 46: 245 - 268.
- Tirelli, A.; De Noni, I. y Resmini, P. (1997) *Bioactive peptides in milk products*. Ital. J. Food Sci. 2: 91 - 98.

- Tomé, D.; Dumontier, A. M.; Hautefeuille, M. y Desjeux, J. F. (1987) *Opiate activity and transepithelial passage of intact  $\beta$ -casomorphins in rat ileum*. Am. J. Physiol. 253: 737 - 744.
- Trompette, A.; Claustre, J.; Caillon, F.; Jourdan, G.; Chayvialle, J. A. y Plaisancie, P. (2003) *Milk Bioactive peptides and  $\beta$ -casamorphine induced mucus release in rat jejunum*. J. Nutr. 133: 3499 - 3503.
- Tsai, C. H.; Yen, Y. H. y Yang, J. P. W. (2015) *Finding of polysaccharide-peptide complexes in Cordyceps militaris and evaluation of its acetylcholinesterase inhibition activity*. J. Food Drug Anal. 23: 63 - 70.
- Unger, T.; Rockhold, R. W.; Bönner, G.; Rascher, W.; Schaz, K.; Speck, G.; Schömig, A. y Ganten, D. (1981) *Antihypertensive effects of the novel converting-enzyme inhibitor YS980 in spontaneously hypertensive rats*. Clin. Exp. Hypertens. 3: 121 - 140.
- Veldman, B. (2004) *Mycotoxins in the animal production chain*. En *Meeting the mycotoxin menace*. (Eds: Barug, D.; van Egmond H.; López-García, R.; van Osenbruggen T. y Visconti, A.) Wageningen Academia Publishers, The Netherlands, pp. 275 - 280.
- Verduyn, C.; Postma E.; Scheffers, W. y van Dijken, J. (1992) *Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeast: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation*. Yeast. 8: 501 - 517.
- Vermeirssen, V.; Van Camp, J. y Verstraete, W. (2002) *Optimisation and validation of an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition assay for the screening of bioactive peptides*. J. Biochem. Biophys. Methods 51: 75 - 87.
- Vermeirssen, V.; Van-Camp, J. y Verstraete, W. (2004) *Bioavailability of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides*. Brit. J. Nutr. 92: 357 - 366.
- Vinderola, C. G., Mocchiutti, P. y Reinheimer, J. A. (2002) *Interactions among lactic acid started and probiotic bacteria used for fermente dairy products*. J. Dairy Sci. 85: 721 - 729.
- Vinutha, B.; Prashanth, D.; Salma, K.; Sreeja, S. L.; Pratiti, D. y Padmaja, R. (2007) *Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity*. J. Ethnopharmacol. 109: 359 - 363.

- Visser, S. (1993) *Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor*. Anoverview. J. Dairy Sci. 76: 329 - 350.
- von Huth Smith, L.; Borch-Johnsen, K. y Jorgensen, T. (2007) Commuting physical activity is favourably associated with biological risk factors for cardiovascular disease. Eur. J. Epidemiol. 22(11): 771 – 779.
- Walker, G. M. (1998) *Yeast cytology*. En: *Yeast Physiology and Biotechnology* (Eds.: John Wiley y Sons). Wiley, Chichester, pp. 21.
- Walker, J. M. (2002) *The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation*. En: *The protein protocols handbook*, Second edition (Ed. Walker, J. M.) Humana Press, Inc., Totowa, New Jersey, EE.UU. pp. 11 -14.
- Walstra, P. y Jenness, R. (1987) *Proteínas*. En: *Química y física lactológica*. Editorial Acribia S. A., pp. 84.
- Wanasundara, P. K.; Ross, A. R.; Amarowicz, R.; Ambrose, S. J.; Pegg, R. B. y Shand P. J. (2002) *Peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from defibrinated, hydrolyzed bovine plasma*. J. Agric. Food Chem. 50: 6981 - 6988.
- Wang, F.; Zhou, X. L.; Yang, Q. G.; Xu W. H.; Wang, F.; Chen, Y. P. y Chen, G. H. (2011) *A peptide that binds specifically to the  $\beta$ -amyloid of Alzheimer's disease: selection and assessment of anti- $\beta$ -amyloid neurotoxic effects*. PLOS One. 6: 27649.
- Wang, J.; Hu, J.; Cui J.; Bai, X.; Du, Y.; Miyaguchi, Y. y Lin, B. (2008) *Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats*. Food Chem. 111(2): 302 - 308.
- Wang, W. y de Mejia, E. G. (2005). *A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related diseases*. Compr. Rev. Food Sci. F. 4, 63 - 78.
- White, L. A.; Newman, M. C.; Cromwell, G. L. y Lindemann, M. D. (2002) *Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs*. J. Anim. Sci. 80: 2619 - 2628.
- Whitney, R. McL. (1988) *Proteins in milk*. En: *Fundamentals of dairy chemistry. Third edition*. (Ed: Wong, N. P.). van Nostrand Reinhold, New York, pp. 81 - 170.

- Wiechelman, K.; Braun, R. y Fitzpatrick, J. (1988) *Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of groups responsible for color formation*. Anal. Biochem. 175: 231 - 237.
- Wilcox, P. E. (1970) *Chymotrypsinogens-Chymotrypsins*. Methods Enzymol. 19: 64 - 80.
- Wu, H.; He, H. L.; Chen, X. L.; Sun, C. Y.; Zhang, Y. Z. y Zhou, B. C. (2008) *Purification and identification of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from shark meat hydrolysed*. Process Biochem. 43(4): 457 - 461.
- Wu, J. y Ding, X. (2001) *Hypotensive and Physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats*. J. Agr. Food Chem. 49: 501 - 506.
- Wyvratt, M. J. y Patchett, A. A. (1985) *Recent developments in the design of angiotensin converting enzyme inhibitors*. Med. Res. Rev. 5: 485 - 531.
- Yaba Adje, E.; Balti, R.; Kouach, M.; Dhulster, P.; Guillochon, D. y Nedjar-Arroume, N. (2011) *Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin*. Int. J. Biol. Macromol. 49: 143 - 153.
- Yamamoto, N. y Takano, T. (1999) *Antihypertensive peptides derived from milk proteins*. Nahrung, 43: 159 - 164.
- Yamamoto, N.; Akino, A. y Takano T. (1994) *Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from Lactobacillus helveticus CP790*. J. Dairy Sci. 77: 917 - 922.
- Yamamoto, N.; Akino, A., y Takano, T. (1993) *Purification and specificity of a cell-wall associated proteinase from Lactobacillus helveticus CP790*. J. Biochem. 114: 740 - 745.
- Yamamoto, N.; Maeno, M. y Takano, T. (1999) *Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by Lactobacillus helveticus CPN4*. J. Dairy Sci. 82: 1388 - 1393.
- Yiannikouris, A.; Francois, J.; Poughon, L.; Dussap, C. G.; Bertin, G.; Jeminet, G. y Jouany, J. P. (2004) *Adsorption of zearalenone by  $\beta$ -D-glucans in the Saccharomyces cerevisiae cell wall*. J. Food Prot. 67: 1195 - 1200.

- Yiannikouris, A.; Poughon, L.; Cameleyre, X.; Dussap, C. G.; François, J.; Bertin, G. y Jouany, J. P. (2003) *A novel technique to evaluate interactions between Saccharomyces cerevisiae cell wall and mycotoxins: application to zearalenone*. Biotechnol. Lett. 25: 783 - 789.
- Yoshii, H.; Tachi, N.; Ohba, R.; Sakamura, O.; Takeyama, H. y Itani, T. (2001) *Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks*. Comp. Biochem. Physiol. 128: 27 - 33.
- Yust, M.; Pedroche, J.; Girón-Calle, J.; Alaiz, M.; Millán, F. y Vioque, J. (2003) *Production of ACE inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase*. Food Chem. 81(3): 363 - 369.
- Zaghini, A.; Martelli, G.; Roncada, P.; Simioli, M. y Rizzi, L. (2005) *Mannanoglycosaccharides and aflatoxin B1 in feed for laying hens: effects on egg quality, aflatoxins B1 and M1 residues in eggs, and aflatoxin B1 levels in liver*. Poult. Sci. 84: 825 - 832.
- Zare-Zardini, H.; Tolueinia, B.; Hashemi, A.; Ebrahimi, L. y Fesahat, F. (2013). *Antioxidant and cholinesterase inhibitory activity of a new peptide from Ziziphus jujuba fruits*. Am. J. Alzheimer's Dis. Other Demen. 28(7): 702 - 709.
- Zarotsky, V.; Sramek, J. J. y Cutler, N. R. (2003) *Galanthamine hydrobromide: An agent for Alzheimer's disease*. Am. J. Health-Syst. Ph. 60: 446 - 452.
- Zdunczyk, Z.; Juskiewicz, J.; Jankowski, J.; Biedrzycka E. y Koncicki, A. (2005) *Metabolic response of gastrointestinal tract of turkeys to diets with different levels of mannan-oligosaccharide*. Poult. Sci. 84: 903 - 909.
- Zeng, Y.; Wang, N. y Qian, W. (2013) *Production of Angiotensin I-Converting Enzyme inhibitory peptides from peanut meal fermented with Lactic Acid Bacteria and facilitated with Protease*. J. Food. Sci. Technol. 5: 1198 - 1203.
- Zevaco, C. y Gripon, J. C. (1988) *Properties and specificity of a cell-wall proteinase from Lactobacillus helveticus*. Le Lait, 68: 393 - 408.
- Zhang, X. M.; Shi, Y. S. y Wang, C. X. (2006) *Screening of peptide inhibitors of acetylcholinesterase from 12-mer random phage display peptide library*. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 26(7): 1053 - 1054.



Zhao, Y.; Li, B.; Dong S.; Liu, Z.; Zhao, X.; Wang, J. y Zeng. M. (2009) *A novel ACE inhibitory peptide isolated from Acaudina molpadioidea hydrolysed*. Peptides. 30(6): 1028 - 1033.

Zlotnik, H.; Fernández, M. P.; Browsers, B. y Cabib, E. (1984) *Saccharomyces cerevisiae mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity*. J. Bacteriol. 159: 1018 - 1026.

Zucht, H. D.; Forssmann, W. G. y Ständker, L. (2001) *Purification of novel peptide antibiotics from human milk*. J. Chromatogr. 752: 369 - 377.

Zucht, H. D.; Raida, M.; Andermann, K.; Mägert, H. J. y Forsmann, W. G. (1995) *Casocidin-I: a casein- $\alpha_{s2}$ -derived peptide exhibits antibacterial activity*. FEBS Lett. 372: 185 - 188.