



BIOACCESIBILIDAD DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS A PARTIR DE HIDROLIZADOS DE LEVADURA DE CERVEZA RESIDUAL

Aquino, Marilin

Instituto de Tecnología de alimentos, Facultad de Ingeniería Química

Director: Cian, Raul

Codirectora: Drago, Silvina

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: levadura de cerveza residual, bioaccesibilidad, péptidos bioactivos

INTRODUCCIÓN

La levadura de cerveza residual (LCR) es el segundo subproducto más importante generado durante el proceso de elaboración de dicha bebida. La LCR está compuesta principalmente por proteínas de alto valor biológico (70-85%), que oscilan entre el 35 y el 60% del peso seco (Vilela y col., 2000a). Dentro de la matriz proteica se encuentran las manoproteínas (MP). Las mismas poseen residuos de manosas (glicoproteínas) y se localizan principalmente en la pared celular, así como también en el citosol. A la fecha, se ha estudiado su uso como fuente de péptidos bioactivos tales como: inhibidores de acetilcolinesterasa (Spontón y col., 2016), antioxidantes y anti-hipertensivos (Amorim y col., 2019b). Sin embargo, el impacto de la digestión gastrointestinal sobre la bioactividad de dichos péptidos y su bioaccesibilidad no ha sido abordado.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la digestión gastrointestinal (DGI) sobre la bioaccesibilidad de péptidos con propiedades bioactivas obtenidos por hidrólisis enzimática, a partir de un extracto proteico de levaduras residuales de la industria cervecera.

METODOLOGÍA

Se trabajó con levadura de cerveza residual (LCR), a partir de ella se obtuvo un extracto proteico R el cual se lo sometió a una hidrólisis secuencial con enzimas comerciales: 1) 1h

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



con β -glucanasa y 2h con alcalasa, 2) 2h β -glucanasa y 2h con alcalasa, obteniéndose HR1 y HR2 respectivamente. Los hidrolizados fueron caracterizados respecto a los contenidos de proteínas (según Lowry y col. 1951), de manosa (de acuerdo a Zhang y Gu, 1999) y perfil de aminoácidos (según Alaiz y col., 1992). Los hidrolizados fueron sometidos a un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* (DGI) siguiendo el método INFOGEST (Brodkorb y col., 2019) para evaluar la bioaccesibilidad de los péptidos bioactivos. Se obtuvieron dos dializados D1 y D2 y dos digeridos DG1 y DG2 correspondientes a HR1 Y HR2, respectivamente. Los dializados y los digeridos fueron caracterizados de acuerdo a su masa molecular por FPLC según Cian y col. (2018) y perfil de péptidos por HPLC según Zhang y col. (2018).

Se determinaron la actividad antioxidante (AO), la actividad hipoglucemiante (HG) y la antihipertensiva (AH). Las propiedades antioxidantes (AO) se determinaron mediante la inhibición de los radicales ABTS⁺ y DPPH, y mediante la capacidad quelante del cobre (CQ) (Cian y col., 2012). Para la inhibición del ABTS⁺ se determinó la cantidad de proteínas (mg/mL) que inhibe el 50% del radical (IC₅₀), mientras que para determinar la CQ y de inhibición del DPPH, se normalizó la concentración de proteínas a 0,5 mg/mL y 4 mg/mL, respectivamente. Las propiedades hipoglucemiantes (HG) se determinaron a través de ensayos de inhibición de las enzimas α -glucosidasa y dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), según Donkor y col., (2012) y Wang y col., (2017), respectivamente. Para la inhibición de la α -glucosidasa se determinó la cantidad de proteínas (mg/mL) que inhibe el 50% de la actividad (IC₅₀), mientras que para la DPP-IV se determinó el porcentaje de inhibición a una concentración de proteínas de 2 mg/mL. La propiedad antihipertensiva (AH): Se evaluó mediante la capacidad de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA I), utilizando la técnica propuesta por Hayakari y col. (1978) con algunas modificaciones según Cian y col. (2018). Se determinó la cantidad de proteínas (mg/mL) que inhibe el 50% de la actividad enzimática (IC₅₀).

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Los hidrolizados HR1 y HR2 presentaron una relación manosa/proteína de 1,23 y 3,35 mg/100 g, respectivamente. La presencia de manosa en los hidrolizados indicaría una proteólisis efectiva de las manoproteínas presentes en las levaduras residuales. A su vez, la mayor relación manosa/proteínas en HR2 indicaría una mayor proporción de glicopéptidos en dicho hidrolizado respecto a HR1. Estos valores fueron similares a los reportados por Li y col., (2020) para extractos/hidrolizados de LCR.

El perfil de aminoácidos de HR1 y HR2 (Figura 1) mostró un elevado contenido de aminoácidos hidrofóbicos y básicos (51 y 22% del total, y 57 y 12% del total, respectivamente). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Amorim y col. (2019a) para péptidos antioxidantes e inhibidores de ECA-I obtenidos a partir de LCR.

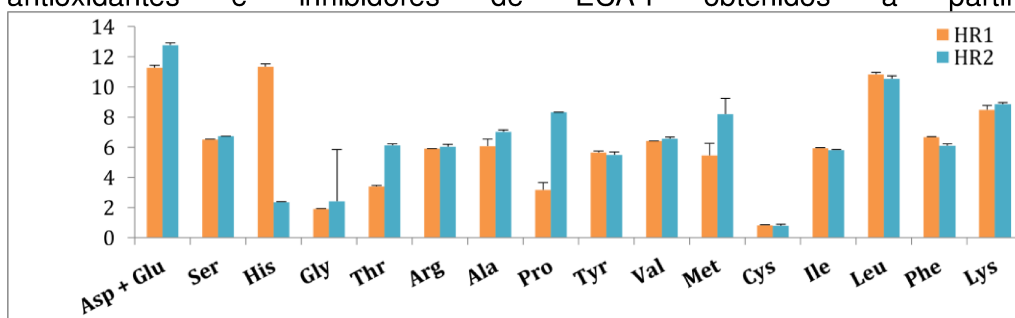


Figura 1: Perfil de aminoácidos (g/100 g proteína) de los hidrolizados HR1 y HR2.

Todas las muestras analizadas por HPLC (HR1, D1, HR2 y D2) presentaron péptidos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos (Figura 2). Se encontró que la DGI generó péptidos bioaccesibles con un perfil diferente, lo que indicaría una potencial degradación de algunos péptidos presentes en los hidrolizados. Por otra parte, la proporción de péptidos de mediana hidrofobicidad fueron similares entre los hidrolizados y no se modificaron por la DGI.

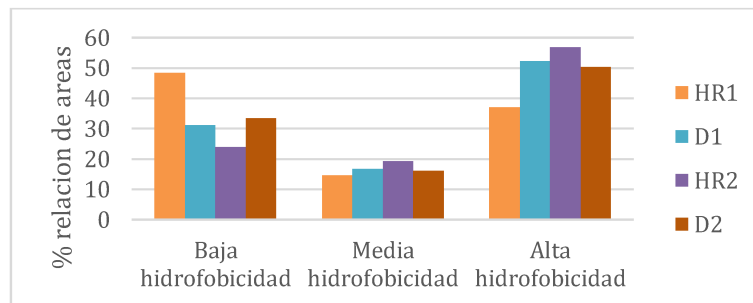


Figura 2: Relaciones de áreas tomadas del perfil cromatográfico por HPLC de las muestras. Baja hidrofobicidad: área 0-20 min; media hidrofobicidad: 21-35 min; alta hidrofobicidad: 36-52 min.

Para ambos hidrolizados, el tamaño medio de las moléculas resultó ser de 2000 Da. No obstante, HR1 también presentó especies moleculares de mayor tamaño (160kDa). Para D1 y D2 el perfil evidenció moléculas de menor tamaño, siendo el mismo 1200 Da y 1300 Da respectivamente. Para el caso de DG1 y DG2, se observó un tamaño medio de 1300 Da. Esto demuestra, al igual que lo observado con el perfil de péptidos por HPLC, que la DGI influyó en el tamaño de los péptidos, parte de los cuales seguramente sufrieron un proceso de proteólisis.

Los valores de IC50 para la inhibición del ABTS resultaron de $1,42 \pm 0,10$, $1,91 \pm 0,00$, $2,21 \pm 0,001$, $1,71 \pm 0,00$, $2,12 \pm 0,00$ y $2,69 \pm 0,00$ mg proteínas/mL para HR1, D1, DG1, HR2, D2 y DG2 respectivamente. HR1 presentó mayor actividad que el HR2. Además se pudo ver que la DGI afectó el potencial antioxidante, reduciendo la actividad respecto al hidrolizado de partida. Sin embargo, dializaron más péptidos antioxidantes de los que quedaron en el digerido.

En cuanto a la CQ, los valores fueron de $65,41 \pm 3,4\%$, $57,28 \pm 5,7\%$, $50,28 \pm 2,7\%$ y $50,28 \pm 6,5\%$ para HR1, D1, HR2 y D2 respectivamente. Se evidenció que HR1 presenta mayor CQ que HR2. Sin embargo, la DGI produjo una pérdida de la CQ para ambos hidrolizados en un porcentaje del 12% y 13% respectivamente. Respecto a los dializados, D1 presentó mayor %CQ que D2, indicando que los péptidos dializados luego de la DGI de HR1 mantienen más la actividad que los obtenidos a partir de HR2. Estos hallazgos son relevantes debido que hasta la fecha no hay trabajos que se centren en la obtención bioactivos a partir de manoproteínas con propiedades quelante de metales. La inhibición del DPPH fue de $19,24 \pm 4,01\%$ y $11,47 \pm 0,4\%$ para HR1 y HR2 respectivamente, mientras que D1 y D2 no presentaron actividad a la concentración de proteína estudiada, lo que indicaría que la DGI degrada los péptidos activos frente a este radical.

Respecto a la inhibición de la ECA, HR1 presentó menor IC50 que HR2 ($0,68 \pm 0,2$ y $1,29 \pm 0,1$, mg/ml, respectivamente). Sin embargo, esta actividad en los péptidos de HR1 se pierde drásticamente luego de la digestión (IC50 D1: $4,5 \pm 0,1$ mg/mL). Contrariamente, la actividad de D2 fue similar a la de HR2, indicando que los péptidos activos frente a ECA-I fueron menos susceptibles al ataque proteolítico de las enzimas digestivas. Esto es relevante, ya que si se desea desarrollar un suplemento dietario a partir de HR1 resulta imperante su

protección frente al ambiente gastrointestinal. Esto permitiría presevar la bioactividad de los péptidos inhibidores de ECA-I, manteniéndolos activos hasta el sitio de absorción. Sólo los digeridos de los hidrolizados presentaron actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa donde la IC50 resultó de $0,24 \pm 0,0$ y $0,27 \pm 0,00$ mg proteína/mL, para DG1 y DG2 respectivamente. En cuanto a la inhibición de la enzima DPP-IV, se pudo observar que el D1 fue el más activo ($37,12 \pm 0,5\%$), siguiéndole en actividad el D2 ($28,8 \pm 2,5\%$). Esto demuestra que los nuevos péptidos generados tras la DGI a partir de los hidrolizados son más inhibidores de la enzima DPP-IV (incremento de 30% en la actividad) que los presentes en los hidrolizados ($27,60 \pm 1,8\%$ y $22,15 \pm 2,5\%$, para HR1 y HR2 respectivamente). Por lo tanto, la DGI promueve la formación de péptidos con actividad inhibitoria de las enzimas digestivas que participan en el metabolismo de hidratos de carbono o regulación de la glucemia. En ambos casos, estos hidrolizados serían interesantes para desarrollar suplementos o ingredientes con propiedades antidiabéticas.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Alaiz, M.; Navarro, J.; Giron, J.; y Vioque, E. (1992).** Amino acid analysis by highperformance liquid chromatography after derivatization with diethylethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography*, 591, 181-186.
- Amorim, M., Marques, C., Pereira, J. O., Guardao, L., Martins, M. J., Osorio, H. (2019a).** Antihypertensive effect of spent brewer yeast peptide. *Process Biochemistry*, 76, 213–218.
- Amorim, M., Pinheiro, H., y Pintado, M. (2019b).** Valorization of spent brewer's yeast: Optimization of hydrolysis process towards the generation of stable ACE-inhibitory peptides. *Lwt*, 111, 77-84.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., y Recio, I. (2019).** INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature protocols*, 14(4), 991-1014.
- Cian, R. E., Garzón, A. G., Martínez-Augustin, O., Botto, C. C., y Drago, S. R. (2018).** Antithrombotic activity of brewers' spent grain peptides and their effects on blood coagulation pathways. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(3), 241-246.
- Cian, R. E., Martínez-Augustin, O., y Drago, S. R. (2012).** Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. *Food Research International*, 49(1), 364–372.
- Donkor, O. N., Stojanovska, L., Ginn, P., Ashton, J., y Vasiljevic, T. (2012).** Germinated grains—Sources of bioactive compounds. *Food chemistry*, 135(3), 950-959.
- Hayakari, M., Kondo, Y., & Izumi, H. (1978).** A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Analytical biochemistry*, 84(2), 361-369.
- Li, J., Karboune, S., y Asehraou, A. (2020).** Mannoproteins from inactivated whole cells of baker's and brewer's yeasts as functional food ingredients: Isolation and optimization. *Journal of food science*, 85(5), 1438-1449.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951)** Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 256-275.
- Spontón, P. G., Spinelli, R., Drago, S. R., Tonarelli, G. G., y Simonetta, A. C. (2016).** Acetylcholinesterase-inhibitor hydrolysates obtained from 'in vitro' enzymatic hydrolysis of mannoproteins extracted from different strains of yeasts. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(2), 300-308.
- Vilela, E. S. D., Sgarbieri, V. C., y Alvim, I. D. (2000a).** Valor nutritivo da biomassa de células íntegras, do autolisado e do extrato de levedura originária de cervejaria. *Revista de Nutrição*, 13, 127-134.
- Wang, T. Y., Hsieh, C. H., Hung, C. C., Jao, C. L., Lin, P. Y., Hsieh, Y. L., & Hsu, K. C. (2017).** A study to evaluate the potential of an in silico approach for predicting dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity in vitro of protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 234, 431-438.
- Zhang, Q.; Song, C.; Zhao, J.; Shi, X.; Sun, M.; Liu, J.; Fu, Y.; Jin, W. y Zhu, B., (2018).** Separation and characterization of antioxidative and angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from jellyfish gonad hydrolysate. *Molecules*, 23, 94-109.
- Zhang, Y., y Gu, W. (1999).** Determination of mannose in yeast by ultraviolet spectrometry. *Food and Fermentation Industries*, 25, 32-36.