

## MANOPROTEÍNAS AISLADAS DE DIFERENTES ESPECIES DE LEVADURAS COMO NUEVAS FUENTES DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Pablo Spontón<sup>1,2</sup>, Georgina Tonarelli<sup>2</sup>, Arturo Simonetta<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Cátedras de Microbiología y Biotecnología, Dto. de Ingeniería en Alimentos, FIQ-UNL.

<sup>2</sup>Departamento de Química Orgánica, FBCB-UNL.

E-mail: psponton@fcb.unl.edu.ar

### Introducción

Actualmente han irrumpido con fuerza en el sector alimentario los alimentos funcionales. Los mismos se definen como alimentos y componentes alimentarios que proporcionan beneficios más allá de sus valores nutricionales tradicionales, bien sea mejorando una función del organismo o reduciendo el riesgo de enfermedad<sup>1</sup>. Las investigaciones realizadas para diseñar y elaborar estos alimentos han dedicado especial atención al estudio del papel fisiológico de las proteínas de la dieta. Péptidos bioactivos encriptados en las estructuras de las proteínas, se generan usualmente *in vivo* por acción de las enzimas gastrointestinales, pero pueden también obtenerse *in vitro* con enzimas específicas, o producirse durante los procesos biotecnológicos de elaboración de determinados alimentos. Se han descrito péptidos bioactivos con diferentes actividades, las que incluyen propiedades antimicrobianas, efectos anti-hipertensivos, capacidad para reducir el nivel de colesterol, actividades antioxidantes y antitrombóticas, efectos cito o inmunomodulatorios y actividades opiodes<sup>2</sup>.

Se han obtenido péptidos bioactivos a partir de diferentes matrices alimentarias de origen animal y vegetal. Un grupo microbiano de interés y que participa en la maduración de diversos tipos de alimentos es el constituido por las levaduras. Éstas poseen manoproteínas en sus paredes celulares, compuestos hasta ahora muy poco investigados, pero ya reconocidos como los mejores bioemulsificantes<sup>3</sup>. La utilización de levaduras o de extractos provenientes de sus paredes celulares en las dietas de pollo produjo la disminución de la adhesión sobre las paredes intestinales de distintas especies y cepas de *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Campylobacter jejuni*<sup>4</sup>. Por otro lado, existen evidencias de que péptidos obtenidos de dichas manoproteínas por hidrólisis enzimática pueden actuar como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)<sup>5</sup>.

La enzima Acetilcolinesterasa (AChE) hidroliza al neurotransmisor acetilcolina, dando ácido acético y colina. Desde la aprobación de galantamina para el tratamiento del Alzheimer, que actúa mediante el bloqueo de la degradación de la acetilcolina, la búsqueda de otros inhibidores de esta enzima se ha intensificado notablemente.

Se analizaron manoproteínas de levaduras aisladas de productos lácteos. Dichas manoproteínas se hidrolizaron utilizando enzimas proteolíticas comerciales, y a los extractos peptídicos originados se les determinó su actividad antimicrobiana y su capacidad inhibitoria frente a la AChE.

### Resultados y discusión

En este estudio fueron analizadas manoproteínas de cinco cepas de levaduras aisladas de productos lácteos de las regiones patagónica y santafesina, pertenecientes a los géneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Pichia* y *Saccharomyces*. Las manoproteínas se extrajeron mediante tratamiento en autoclave de una suspensión de células en buffer citrato<sup>3</sup>, obteniéndose significativas cantidades de extractos no purificados de las paredes celulares, a partir de cultivos de cada una de las cepas de levaduras ensayadas.

Posteriormente, los mismos se purificaron parcialmente por cromatografía de afinidad, utilizando Concanavalina A-Sepharose 4B como ligando, y por diálisis. La presencia y concentración de proteínas totales se evaluó por el método del ácido bicinónico, obteniéndose valores comprendidos entre 50 y 200  $\mu\text{g/ml}$ . Los pesos moleculares de las manoproteínas purificadas se determinaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio y en todos los casos estuvieron comprendidos entre aproximadamente 6.5 y 30 kDa.

Cada extracto de manoproteína se hidrolizó con tres enzimas proteolíticas (Tripsina, Pepsina y Proteinasa K) por 24h a 37°C, originándose péptidos de menor peso molecular. A dichos hidrolizados se les evaluó posteriormente la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar frente a bacterias Gram (+) y Gram (-) causantes de ETAs y/o alterantes de alimentos. También se investigó su actividad inhibitoria frente a AChE por el método de Ellman (1961)<sup>6</sup>.

Con respecto a la actividad antimicrobiana, todos los extractos hidrolizados con Tripsina fueron activos contra *Bacillus cereus*, con diámetros de halos comprendidos entre 14 y 18mm. Además, se comprobó actividad inhibitoria del extracto de manoproteínas de *Pichia anomala* hidrolizado con Tripsina frente a *Listeria monocytogenes*, con un diámetro de halo de 7mm. Los extractos hidrolizados con las enzimas Pepsina y Proteinasa K no produjeron inhibición de las cepas bacterianas utilizadas como blanco en los ensayos.

Se comprobó también actividad inhibitoria frente a AChE por parte de cinco extractos hidrolizados. Dichos extractos fueron los hidrolizados de las manoproteínas de *Saccharomyces cerevisiae* con Proteinasa K y Pepsina, de *Candida blankii* con Tripsina, de *Brettanomyces intermedius* con Pepsina y de *Candida famata* con Proteinasa K, dando valores de inhibición comprendidos entre 27 y 60%.

Estos resultados indican la potencial formación de una gran cantidad y variedad de péptidos, los cuales presentan una interesante actividad biológica.

### Conclusiones

El conjunto de datos obtenidos en este trabajo confirman la posibilidad de aislar y purificar parcialmente distintas manoproteínas de cepas de levaduras obtenidas de ecosistemas alimentarios regionales. En lo que respecta a la actividad antimicrobiana, se observó que la hidrólisis enzimática con tripsina generó péptidos antibacterianos especialmente activos contra *B. cereus* y *L. monocytogenes*. Por otra parte, cinco de los extractos hidrolizados con las tres enzimas proteolíticas ensayadas presentaron importante actividad inhibitoria frente a la AChE. Por lo tanto, se concluye que pueden generarse péptidos bioactivos a partir de la hidrólisis enzimática *in vitro* de manoproteínas de levaduras, que pueden llegar a ser de gran interés para la formulación de alimentos con potenciales propiedades funcionales.

### Referencias

- 1) Martínez A.O., Martínez de Victoria Muñoz E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*, 21 (2): 1-14.
- 2) Meisel H. (2004). Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors*, 21: 55-61.
- 3) Cameron D., Cooper D. and Neufeld R. (1988). The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 1420-1425.
- 4) Burkey T.E., Dritz S.S., Nietfeld J.C., Johnson B.J. and 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*. *Journal Animal Science*, 82: 397-404.

5) Kanauchi O., Igarashi K., Ogata R., Mitsuyama K. and Andoh A. (2005). A yeast extract high in bioactive peptides has a blood-pressure lowering effect in hypertensive model. *Current Medical Chemistry* 12: 3085-3090.

6) Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr. and Featherstone R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95.