



Biofábrica de péptidos bioactivos en innovación alimentaria

Biofactory of bioactive peptides in food innovation

Juan Daniel Hernandez Dominguez¹, Hector Gaspar Robles², Alejandra Gonzalez Rodriguez³, Guadalupe Galindo Murillo³, Edgar David Mendez Pérez⁴, Ma. Fabiola León Galván⁵.

¹ Universidad Popular de la Chontalpa, División de Ciencias Básicas e Ingenierías. P.E. Químico Farmacéutico Biólogo.

² Tecnológico Nacional de México, Campus Villahermosa, Departamento de Ingeniería Bioquímica.

³ Departamento de Ingeniería Química, P.E Ing. Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato.

⁴ Departamento de Ingeniería Agroindustrias, P.E Ing. En Biotecnología, División de Ciencias de la Salud e Ingeniería, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

⁵ Departamento de Alimentos, Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato.

fabiola@ugto.mx

Resumen

En este estudio, nos enfocamos en la biofábrica de péptidos bioactivos para la innovación alimentaria, utilizando la cianobacteria *Arthrospira platensis*. Esta cianobacteria emplea el hidrógeno del agua como dador de electrones y CO₂ como fuente de carbono, además de la luz para su crecimiento. El objetivo de este trabajo fue establecer el cultivo de la cianobacteria en un biorreactor y determinar su cinética de crecimiento durante 26 días. Se obtuvo que, al día 26, el cultivo de *Arthrospira platensis* tiene un contenido de proteína de 63% y que la hidrólisis de estas proteínas, ya sea por métodos químicos o biológicos, puede liberar péptidos bioactivos que, incorporados a alimentos funcionales, pueden contribuir a la seguridad y sostenibilidad alimentaria.

Palabras clave: Espirulina, Compuestos Bioactivos, .

Introducción

El crecimiento acelerado de la población y las enfermedades crónicas no degenerativas causadas por la mala alimentación ponen en alerta la necesidad de proponer fuentes sustentables y sostenibles que garanticen la calidad e inocuidad alimentaria. *Arthrospira platensis* es una cianobacteria de importancia comercial y se considera un superalimento por su contenido de proteína (50-70%), aminoácidos esenciales, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas y minerales. Taxonómicamente pertenece al reino Bacteria, filo Cyanobacteria, clase Cyanophyceae, orden Oscillatoriales, familia Microcoleaceae y género *Arthrospira*. Se caracteriza por su forma filamentososa helicoidal, con tricomas que pueden medir varios micrómetros de largo. Este organismo fototrófico es capaz de realizar fotosíntesis oxigénica similar a las plantas. La morfología helicoidal de *A. platensis* no solo es uno de los aspectos más llamativos de este microorganismo, si no que esta estructura está conformada por células individuales que se dividen por fisión binaria. Estas células son cilíndricas y dispuestas en una estructura multicelular tricomática sin envoltura mucilaginosa. Su color verde-azul se debe a la presencia de pigmentos como la clorofila a y la ficocianina y, en menor medida, carotenoides. Nuestro grupo de trabajo ha encontrado péptidos bioactivos con actividades antihipertensiva, anti-diabesidad, antioxidante, moduladores metabólicos, que pueden ser utilizados como biofármacos o para suplementar alimentos funcionales. *Arthrospira* tiene la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica, utiliza agua como dador de electrones y dióxido de carbono como fuente de carbono que es transformado en carbono orgánico que posteriormente producirán carbohidratos, grasas y proteínas. De esta manera mitiga emisiones de gases de invernadero y al mismo tiempo se obtiene biomasa que puede ser aprovechada para la alimentación. En ese sentido, el objetivo principal de esta investigación es optimizar las condiciones de producción de biomasa de *Arthrospira* usando CO₂ como fuente de carbono para la obtención de proteína y péptidos bioactivos, sea reproducible y se le pueda denominar biofábrica de péptidos bioactivos.

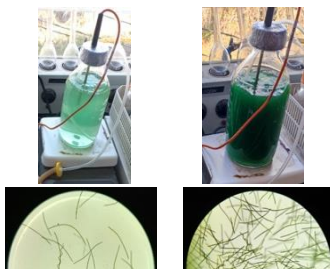


Figura 1. Cultivo de *Arthrospira platensis*. A) Reactor, b) fotografía vista al microscopio..

Materiales y métodos

Cultivo de la cepa. La cepa de *Arthrospira platensis* fue cultivada en medio Zarrouk como se muestra en la tabla 1. Las soluciones A y B se prepararon por separado para que al esterilizar a 121°C por 15 min no se precipitaran metales. La solución C se preparó por separado y se esterilizó por filtración usando un filtro de 0.22 µm. Se mezclaron las soluciones A y B en relación 1:1, y se agregó 1 mL de la solución C por cada litro de mezcla. El cultivo se llevó a cabo en un frasco con capacidad de 1 litro con una absorbancia a 560 nm inicial de ~0.1 con un litro de medio Zarrouk a una temperatura de 30°C ±1, luz natural, aireación de 0.3 L/min y agitación a 300 rpm durante 26 días.

Cosecha de biomasa. El contenido del frasco se hizo pasar a través de una malla de 100 µm seguido de varios lavados con agua estéril para retirar el exceso de sales. El resultante se almacenó en un recipiente estéril apto para congelar y liofilizar. Se congeló a -20°C para después ser liofilizada y posteriormente almacenada a -20°C para sus posteriores estudios.

Extracción de proteína. Para la extracción de proteína se realizó por el método de TCA con acetona y DTT presentado por Xie et al., 2007 con algunas modificaciones. Brevemente, se tomaron 5 mL donde se encuentra *A. platensis* y se centrifugó a 3000xg por 1 min. El sobrenadante se filtró en una membrana de 0.22 µm. El sobrenadante se filtró de nuevo y se mezcló con al menos 3 volúmenes de una solución de TCA (ácido tricloroacético 20% y 0.14% (p/v) de DTT). La mezcla se incubó toda la noche a -20°C. Una vez que precipitaron las proteínas, se centrifugaron a 3900xg por 5 min a 4°C. La pastilla que resultó se lavó varias veces con una solución preparada (DTT 0.07% (p/v) y 80% acetona agua MiliQ o acetona al 90%), y se secó a temperatura ambiente se resuspendió en una solución de urea (2M) 1-2 mL y se almacenó para su posterior cuantificación por el método de Bradford.

Análisis de la proteína por SDS-PAGE. Se realizó conforme al método descrito por (Haider et al., 2012), Para la preparación de la muestra se mezclaron 10 µL de muestra con 10 µL de buffer de carga Laemli 2X, y la mezcla se calentó a baño maría en agua hirviendo (~100°C) durante 10 min.

Hidrólisis de proteínas. Se utilizarán 2 enzimas, pepsina y tripsina para realizar la hidrólisis. Para realizarlo, se preparó una solución de 3% (v/v) de proteína extraída unos pasos más arriba. Las condiciones en las que se realizó la hidrólisis serán: pepsina, pH 2, temperatura de 37°C y una concentración de 6% (w/w) enzima/sustrato y para tripsina, pH 8, temperatura de 42°C y una concentración de 3% (w/w) enzima/sustrato, ambas llevadas a cabo durante 10 h. Al final de la hidrólisis, se inactivaron las enzimas elevando la temperatura a 90°C por 15 min, se enfriaron a temperatura ambiente y la solución se centrifugó a 8694xg a 4°C por 45 min, se recolectó el sobrenadante como hidrolizados proteicos. Se liofilizaron y se conservan a -20°C.

Resultados y discusión

Obtención de biomasa de *Arthrospira platensis*

El de crecimiento de *A. platensis*, se realizó por duplicado, tuvo una duración de 26 días,. Al día 14, *Arthrospira platensis* alcanzó una D.O. (densidad óptica) a 560 nm de 1.5 y en otro ensayo de 1.2, comenzando con un cultivo inicial a 0.1 (Figura 2).

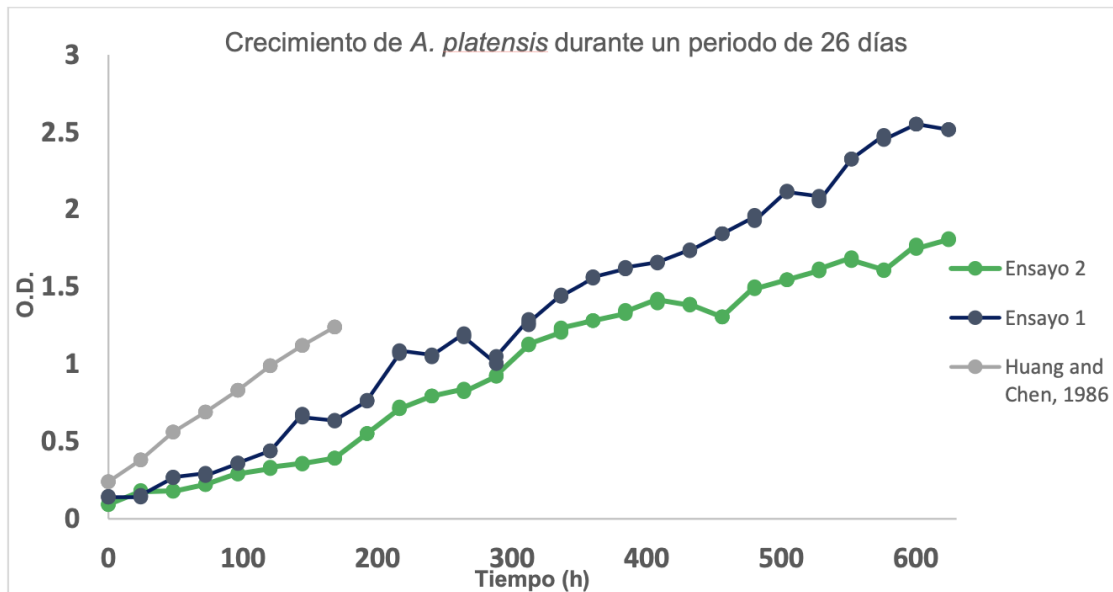


Figura 2. Gráfica donde se compara el crecimiento de nuestros ensayos, comparada con los obtenidos por Huang y Chen..

Extracción de proteína total de *Arthrospira platensis*

La extracción de proteína se realizó siguiendo el método TCA-A, descrito en materiales y métodos; se obtuvieron 3 proteínas mayoritarias de aproximadamente 100, 55 y 25 kDa como se muestra en la figura 3, esto coincide con lo reportado por Irvani et al., 2023, quienes realizaron extracción de proteína a diferentes pH, encontrando que a pH 7 empleando agua como solvente se tienen 3 bandas que corresponden a las que se obtuvieron en este estudio (Figura 3). La cianobacteria *A. platensis* es ampliamente conocida por sintetizar la ficocianina-C, entre otras ficobiliproteínas. Dichas ficobiliproteínas son complejos proteína-pigmento, responsables de captar la luz en las cianobacterias y se encuentran bajo la superficie de la membrana tilacoide y pueden comprender hasta el 60% de la proteína total soluble en la célula (Pan-utai & Iamtham, 2019). Ficocianina-C es la que se encuentra en mayor concentración y se le atribuyen usos tanto como industriales usándola en la formulación de alimentos como colorante azul-verde, incluso llegando a ser usada en la industria farmacéutica para el tratamiento de diversas enfermedades por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatoria e incluso con actividad anti carcinogénica (Pez Jaeschke et al., 2021). Ficocianina-C se compone de dos subunidades α y β , con un peso molecular de 16 y 17 kDa, respectivamente (Kumar et al., 2014). Dichas bandas se pueden observar en la figura 3, corresponden a los pesos de 16 y 17 kDa, indicando la presencia de la ficocianina-C. Otra proteína de interés es la aloficocianina que se encuentra en el núcleo de complejos de los ficobilisomas. Juega un rol muy importante en la transferencia de energía en los ficobilisomas; y también como materia prima para la formulación de fármacos debido a que se le han atribuido efectos antitumorales (Song et al., n.d.).

Hidrolisados de proteína total de *Arthrospira platensis*

Para conocer la eficiencia del hidrolizado de la proteína de *Arthrospira platensis*, en un gel de electroforesis SDS-PAGE (Figura 3) se observó como desaparecían las bandas y se observó un barrido, y este principalmente de menor peso molecular, esto indica que la ruptura del enlace peptídico entre aminoácidos y empieza a liberar péptidos bioactivos que se encuentran encriptados en la proteína. De forma complementaria, para conocer sobre las bioactividades biológicas de los posibles péptidos liberados al hidrolizar nuestra proteína con las diferentes enzimas realizamos un análisis *in silico* utilizando la herramienta de BIOPEP. Para ello se utilizaron las secuencias de 2 proteínas: ficocianina-C y aloficocianina usando las secuencias previamente reportadas en la base de datos del NCBI, cuidando que todas hayan sido reportada.

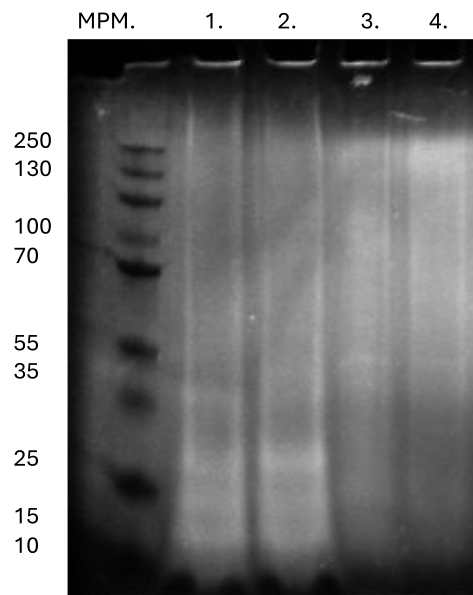


Figura 3. Proteína e hidrolizados de *Arthrospira platensis*. Carril 1 y 2 .Proteína de *A. platensis* .Carril 3 y 4 hidrolizados de *A. platensis*.

Los resultados obtenidos hasta este momento indican el potencial que tienen las actividades biológicas de los posibles péptidos a extraer se concentran en la inhibición de la dipeptidil peptidasa IV e inhibición de la ACE, si bien cuenta con más funciones bastante interesantes pueden ser usadas para futuros estudios.

Bibliografía/Referencias

- Haider, S. R., Reid, H. J., & Sharp, B. L. (2012). Tricine-SDS-PAGE. *Methods in Molecular Biology*, 869, 81–91. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_8
- Irvani, N., Leong, S., Carne, A., Agyei, D., & Oey, I. (2023). Impact of High-Speed Homogenisation Followed by pH Treatment of *Arthrospira platensis* on Protein Accessibility and In Vitro Protein Digestibility. *Food and Bioprocess Technology*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03269-w>
- Kumar, D., Dhar, D. W., Pabbi, S., Kumar, N., & Walia, S. (2014). Extraction and purification of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* (CCC540). *Indian Journal of Plant Physiology*, 19(2), 184–188. <https://doi.org/10.1007/s40502-014-0094-7>
- Pan-utai, W., & Iamtham, S. (2019). Extraction, purification and antioxidant activity of phycobiliprotein from *Arthrospira platensis*. *Process Biochemistry*, 82, 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.04.014>
- Song, X., Xu, N., Zang, X.-N., Shang, M.-H., Sun, J.-F., Bi, Y., & Xu, X.-T. (n.d.). *Fluorescence and antioxidant activity of heterologous expression of phycocyanin and allophycocyanin from Arthrospira platensis*.
- Xie, H., Pan, S., Liu, S., Ye, K., & Huo, K. (2007). A novel method of protein extraction from perennial Bupleurum root for 2-DE. *Electrophoresis*, 28(5), 871–875. <https://doi.org/10.1002/elps.200600354>