



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Actividad biológica de péptidos de amaranto obtenidos por acción de microorganismos



Eugenia Alejandra Orosco Condorí

Dirección: Dra. Adriana Scilingo

Codirección: Dra. Analía Abraham

Marzo 2013

Actividad biológica de péptidos de amaranto obtenidos por acción de microorganismos



Trabajo Final de grado
Licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos
Facultad de Ciencias Exactas-UNLP.

Dirección: Dra. Adriana A. Scilingo
Codirección: Dra. Analía G. Abraham

Lugar de trabajo:

- Laboratorio del Área Bromatología y Control de Alimentos, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.
- Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA).

Agradecimientos

Después de tanto tiempo dedicado a este trabajo quiero agradecer a muchas de las personas que me aconsejaron, me apoyaron, me dieron aliento y me ayudaron a llegar aquí.

Primero a mis amigas que siempre me dieron aliento para seguir, para estudiar y no bajar los brazos... A Luciana, Victoria, Eugenia, Solange, Analía, Natalia S., Natalia B., Lorena y Valeria.

A los Profesores y JTPs con los que compartí horas de cátedra, proyectos de extensión, charlas y mates, que siempre se preocuparon por mí y me aconsejaron: Valeria Arce, Yanina Rosso, Rosana Romano, Roberto Moreno, Claudio Voget y Laura Briand.

A mis compañeros de las cátedras de Química Inorgánica y de Química Analítica con los que siempre compartimos charlas, experiencias y muchas veces me dieron consejos.

A mis compañeros del grupo de Olimpíadas de Química por las tardes, fines de semana y feriados compartidos: Nadir, Julia, Santiago, Florencia, Belén, Jerónimo, Leonardo, Nicolás, Pablo, Ignacio, Juani, Mara, Gina, Lautaro, Julieta y Brenda.

A mis directoras por tanta paciencia y comprensión a lo largo de todo este tiempo compartido.

A mis compañeros de los laboratorios de Proteínas y Microbiología en el CIDCA y mis compañeros del laboratorio de la Cátedra de Bromatología que siempre tuvieron muy buena predisposición ante mis dudas y consultas.

Gracias a todos!

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	7
1.1	El amaranto	7
1.1.1	Historia de un cultivo ancestral americano	7
1.1.2	Características de la planta y su cultivo	7
1.1.3	Usos de las diferentes partes de la planta	8
1.1.4	Semillas	9
1.1.5	Proteínas de las semillas de amaranto	10
1.1.5.1	Clasificación según solubilidad	10
1.1.5.2	Características estructurales de las proteínas de amaranto	10
1.2	Kefir	12
1.2.1	Características del kefir	12
1.2.2	Gránulos de kefir	12
1.2.3	Composición microbiológica de los gránulos de kefir	13
1.2.4	Elaboración de la leche fermentada	14
1.2.5	Características de la leche fermentada: cambios en macrocomponentes debido a la fermentación	14
1.2.6	Fermentación de otros substratos no lácteos por kefir	15
1.3	Péptidos bioactivos obtenidos a partir de proteínas alimentarias	15
1.3.1	Péptidos bioactivos: definición	15
1.3.2	Obtención de péptidos bioactivos	16
1.3.3	Efectos sobre el organismo	17
1.3.4	Péptidos bioactivos en amaranto	20
2	OBJETIVOS	22
2.2	Objetivos específicos	22
3	MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1	Muestras y condiciones de cultivo	24
3.1.1	Harina de amaranto	24
3.1.2	Cultivos iniciadores-Gránulos de kefir	24

3.1.3	Tratamiento de la harina con gránulos de kefir	24
3.2	Caracterización de las muestras	25
3.2.1	Caracterización microbiológica	25
3.2.1.1	Medios de cultivo y de dilución	25
3.2.1.2	Recuento de microorganismos	25
3.2.1.3	Tinción y observación microscópica	26
3.2.1.3.1	Tinción de Gram	26
3.2.1.3.2	Morfología microscópica de las colonias aisladas	26
3.2.2	Medida de pH	27
3.2.3	Electroforesis en geles de poliacrilamida	27
3.2.3.1	Reactivos	27
3.2.3.2	Muestras	28
3.2.3.3	Patrones	28
3.2.3.4	Armado de los geles	29
3.2.3.5	Desarrollo de los geles y condiciones de corrida	29
3.2.3.6	Fijación, coloración y decoloración	29
3.2.3.7	Obtención de imágenes	29
3.2.4	Determinación del contenido de Nitrógeno	29
3.2.4.1	Determinación del contenido de Nitrógeno Total	29
3.2.4.2	Determinación del contenido de Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (N-TCA)	31
3.3	Medida de las potenciales actividades biológicas	31
3.3.1	Preparación de las muestras	31
3.3.2	Determinación del contenido de proteínas en los extractos	31
3.3.3	Actividad antimicrobiana	31
3.3.3.1	Prueba de difusión en agar	31
3.3.3.2	Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) ..	32
3.3.4	Actividad antitrombótica in vitro	33
3.4	Análisis estadístico	34
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36

4.1.	Características químicas de la harina de amaranto	36
4.2	Caracterización de la suspensión de harina desgrasada de amaranto	36
4.3	Evaluación de la hidrólisis de las proteínas de las suspensiones de harina desgrasada de amaranto durante la incubación	41
4.4	Suspensión de harina desgrasada de amaranto en agua con el agregado de gránulos de kefir	44
4.4.1	Fermentación de la harina desgrasada de amaranto con gránulos de kefir	44
4.4.2	Evaluación de la hidrólisis de las proteínas de las suspensiones de harina desgrasada de amaranto durante la incubación	46
4.4.3	Recuento de microorganismos viables	49
4.5	Selección de las condiciones de fermentación para la obtención de hidrolizados con actividad biológica	50
4.6	Caracterización de las suspensiones de harina de amaranto esterilizadas fermentadas con gránulos de kéfir	51
4.6.1	Solubilidad de proteínas de las suspensiones. Método de Kjeldahl	51
4.6.2	Determinación de proteínas solubles por el método de Hull	52
4.7	Análisis de las propiedades biológicas asociadas a los péptidos de amaranto	53
4.7.1	Determinación de la actividad antimicrobiana	53
4.7.1.1	Prueba de difusión en agar	53
4.7.1.2	Ensayo de inhibición en medio líquido. Determinación de la concentración inhibitoria mínima	54
4.7.2	Determinación de la actividad antitrombótica in-vitro	55
5	CONCLUSIONES	60
6	REFERENCIAS	63

Capítulo 1

Introducción

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El amaranto

1.1.1 Historia de un cultivo ancestral americano

El amaranto, también conocido como kiwicha en la región andina, se cultiva en el continente americano desde hace más de 10.000 años. Su cultivo fue desarrollado por los pueblos mayas, aztecas e incas. Estos pueblos consumían sus hojas verdes en la forma de hortalizas y sus semillas en la forma de harinas. Con la llegada de los españoles al continente americano a finales del siglo XV, el cultivo de amaranto junto con el de otras especies autóctonas fue sustituido por el de otras especies provenientes del Viejo Mundo y sólo se mantuvo su cultivo en pequeña escala para consumo propio.

1.1.2 Características de la planta y su cultivo

El amaranto es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las amarantáceas. El género *Amaranthus* está compuesto por más de 60 especies, siendo las más importantes y las que actualmente se utilizan para la producción de grano: *Amaranthus caudatus*, *Amaranthus hypochondriacus* y *Amaranthus cruentus*. Los amarantos pertenecen al grupo de plantas “C4”, una modalidad fotosintética de alta eficiencia en el aprovechamiento de la radiación solar y de la fijación del dióxido de carbono presente en la atmósfera. Esta característica le confiere adaptación a diversas condiciones agroecológicas muy adversas tales como la sequía, altas y bajas temperaturas y suelos salinos (Segura-Nieto y col., 1994).

Al igual que la quinua, el amaranto fue calificado por la NASA como cultivo CELSS (Controlled Ecological Life Support System). Este programa de la NASA se caracteriza por la búsqueda y selección de sistemas biorregenerativos capaces de suministrar alimento, agua purificada y una atmósfera respirable para las tripulaciones humanas durante futuras misiones espaciales de larga duración (Wallace y Powers, 1990). Entre los criterios que deben cumplir estos cultivos se incluyen rendimiento, calidad nutricional, índice de cosecha y requerimientos nutricionales durante su crecimiento (Qin y col., 2007). Del amaranto se pueden consumir tanto sus hojas como sus semillas, ambas con un elevado contenido de proteínas. Además la planta es capaz de crecer en un amplio rango de condiciones ambientales, incluida la acumulación de sales (Macler y MacElroy, 1989; Qin y col., 2013).

La planta puede alcanzar una altura de 2-2,5 metros. Las hojas pueden ser ovaladas o elípticas, de borde entero, con un tamaño que varía de los 6,5-15 cm. Sus inflorescencias pueden ser terminales o axilares, varían desde totalmente erectas hasta decumbentes, con colores que van del amarillo, anaranjado, rosado hasta el púrpura (Figura 1.1).



Figura 1.1. a) y b) Plantas de amaranto en cultivos a campo abierto.

1.1.3 Usos de las diferentes partes de la planta

El amaranto tiene múltiples usos tanto en la alimentación humana y animal como en la industria, medicina y en la ornamentación.

Para la alimentación humana se utiliza el grano entero o molido en forma de harinas, ya sea tostada, reventada o hervida. Las hojas tiernas reemplazan a las hortalizas de hoja, y las plántulas también se utilizan para consumo. La planta en estado fresco se utiliza como forraje para la alimentación del ganado sobre todo para combinar con otras especies forrajeras. También se utiliza para la producción de concentrados proteicos foliares debido a su alto rendimiento en biomasa verde y alto rendimiento de proteína.

Las semillas hacen una excelente combinación con otros granos para alimentar aves de corral, o para preparar cualquier otro tipo de alimento balanceado para uso animal.

En la industria, el amaranto se utiliza para la obtención de pigmentos vegetales rojo-violetas denominados betacianinas, principalmente la amarantina y la isoamarantina que se utilizan para la coloración de alimentos (Cai y col., 1998).

Además, por los colores vistosos y las formas variadas que presenta la inflorescencia del amaranto, se utiliza como planta ornamental en jardines y parques (Figura 1.2).



Figura 1.2. a) a d) Diversas formas de inflorescencias del amaranto.

1.1.4 Semillas

Las semillas de amaranto son granos en forma de discos que tienen un tamaño de entre 1 y 2 mm de diámetro. Su color varía del blanco al negro, pasando por el dorado y morado, dependiendo de la especie de la cual provengan (Figura 1.3).

El componente principal de la semilla de amaranto es el almidón, que representa entre el 50 y 60% de su peso seco. El diámetro del gránulo de almidón posee un tamaño de entre 1-3 micrones, mucho menor que el de otras especies vegetales, motivo por el cual su digestión se ve facilitada.



Figura 1.3 Semillas de amaranto a) tamaño real, b) aumento 5x.

Las semillas de amaranto presentan un interesante contenido de proteínas (12-18 % p/p) y mayores niveles de lisina que los cereales (Barba de la Rosa y col., 1992). El contenido de proteínas se incrementa hasta el 20% en las harinas desgrasadas y hasta el 75% en los aislados proteicos de amaranto. Asimismo, el contenido lipídico de las semillas de amaranto presenta un atractivo balance de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados junto con elevados niveles de escualeno (Berganza y col., 2003; Rodas y Bressani, 2009).

1.1.5 Proteínas de las semillas de amaranto

1.1.5.1 Clasificación según solubilidad

La clasificación de Osborne (Osborne, 1924) permite dividir a las proteínas en 4 grupos según su solubilidad:

- a) Albúminas, que es la fracción extraíble con agua.
- b) Globulinas, que es la fracción extraíble con soluciones salinas diluidas.
- c) Prolaminas, que es la fracción extraíble con soluciones alcohólicas.
- d) Glutelinas, que es la fracción extraíble con soluciones ácidas o alcalinas.

En el amaranto se encuentran representantes de las albúminas, de las globulinas y las glutelinas siendo insignificante la proporción de prolaminas.

1.1.5.2 Características estructurales de las proteínas de amaranto

La fracción albúminas está compuesta por polipéptidos de diversos tamaños la mayoría entre 10 y 43 kDa (Marcone, 2000; Segura-Nieto y col., 1992), encontrándose

también algunos polipéptidos de mayor peso molecular, hasta 94 kDa (Martínez y Añón, 1996; Barba de la Rosa y col., 1992; Konishi y col., 1991). La mayoría de los polipéptidos son monoméricos y no dissociables por β -mercaptoetanol.

Las globulinas son las proteínas mayoritarias en el amaranto, del 20 al 60% del total de las proteínas. Las globulinas de amaranto están principalmente constituidas por cantidades equivalentes de globulina 11S (Segura-Nieto y col., 1994; Chen y Paredes-López, 1997; Martínez y col., 1997) y globulina-P, que también pertenece a la familia 11S, pero presenta gran tendencia a polimerizarse y posee menor solubilidad en soluciones salinas neutras (Martínez y col., 1997). En mucha menor proporción se encuentra una globulina 7S descrita por Barba de la Rosa y col. (1992) y Martínez y col. (1997). Los estudios realizados por Marcone y Kakuda (1999) sobre esta fracción indican que es un heteroligómero de 186 kDa constituido por ocho subunidades, de diferentes tamaños entre 15 y 90 kDa, unidas de modo no covalente.

De la globulina 11S se han determinado características estructurales (Marcone y col., 1998; Salnikow y col., 1998) y se ha clonado y secuenciado el cDNA que codifica para uno de sus polipéptidos (Osuna-Castro y col., 2000). Esta globulina está constituida por subunidades polipeptídicas de diferentes tamaños. En el estado nativo estos polipéptidos se encuentran interaccionando para formar un heteroligómero (Salnikow y col., 1998). Como otras globulinas de la familia de las 11S, las subunidades están formadas por un polipéptido ácido (A) y uno básico (B) unidos por enlaces puente disulfuro.

El amaranto posee otra fracción globulínica, descrita por primera vez por Konishi y col., (1991), la cual denominó albúmina-2. Es una proteína tipo 11S, soluble en agua y soluciones salinas de baja fuerza iónica, pero insoluble en concentraciones de NaCl mayores que 0,1M. Su pI aparente se encuentra entre 5 y 6 y su composición polipeptídica es igual a la de la globulina 11S pero con mayor proporción de las subunidades de 56 kDa no diméricas (Konishi y col., 1991, Martínez y col., 1997). Una característica particular de esta proteína es su alto grado de polimerización con sólo aproximadamente un tercio de sus moléculas no agregadas. Las mismas mostraron una masa molecular cercana a 300 kDa. Teniendo en cuenta sus aspectos moleculares y su presencia en cuerpos proteicos se sugirió la denominación de globulina polimerizada (Gp) (Martínez y col., 1997; Castellani y col., 1998; Castellani y col., 2000).

La fracción prolaminas se encuentra en muy baja proporción en el amaranto. Se ha descrito que esta fracción está constituida por polipéptidos de baja masa molecular

(entre 10 y 22 kDa), aunque existen algunas discrepancias en estudios realizados acerca de los componentes mayoritarios (Castellani, 2000).

Las glutelinas de amaranto (18%), si bien se diferencian de las globulinas por ser solubles sólo a pHs extremos presentan composición polipeptídica y características estructurales similares a la globulina-P (Abugoch, 2006). En medio desnaturante en presencia de 2-mercaptoetanol se observan polipéptidos de masas moleculares semejantes a las globulinas, en general se detecta una banda entre 54-60 kDa, y entre dos y tres bandas en las regiones de 35-38 kDa y 24-26 kDa respectivamente, junto con una baja proporción de polipéptidos agregados que no entran al gel (Gorinstein y col., 1998 y 2001; Barba de la Rosa y col., 1992).

1.2 Kefir

1.2.1 Características del kefir

El kefir es una leche ácida fermentada que se consume desde hace miles de años. Esta bebida tiene su origen en las montañas del Cáucaso situadas en el límite entre Europa y Asia. El kefir se distingue de otras bebidas fermentadas en que se elabora a partir de gránulos de kefir que contienen una mezcla compleja de bacterias y levaduras (Saloff-Coste, 2005).

El kefir posee características organolépticas distintivas debidas a pequeñas cantidades de dióxido de carbono, alcohol y moléculas aromáticas como diacetilo y acetaldehído, que son producidos durante la fermentación de la leche. Además, durante el proceso de fermentación se produce una reducción en el contenido de lactosa y un ligero incremento en la proteólisis generando un aumento de péptidos y aminoácidos libres (Zourari y Anifantakis, 1988).

1.2.2 Gránulos de kefir

Los gránulos de kefir son masas irregulares, gelatinosas que presentan un color blanco a ligeramente amarillo. Su matriz está compuesta por proteínas y polisacáridos. Contiene bacterias y levaduras que están involucradas en el proceso de fermentación. La microbiota del gránulo se mantiene relativamente estable en el tiempo estableciéndose entre ellos una compleja relación simbiótica (Farnworth, 2005).

El tamaño de los gránulos es variable, yendo desde varios milímetros a 2-3 cm de diámetro. Su forma es similar a las flores de la coliflor o al maíz inflado (Garrote y col., 2001) (Figura 1.4).



Figura 1.4. Gránulos de kefir utilizados en este trabajo.

1.2.3 Composición microbiológica de los gránulos de kefir

La microflora del kefir depende del origen de los gránulos, de las condiciones de cultivo y de las condiciones de conservación de los gránulos, entre otras (Garrote y col., 1997; Garrote y col., 1998). La microbiota de los gránulos de kefir está compuesta por bacterias lácticas, bacterias ácido acéticas y levaduras fermentadoras y no fermentadores de la lactosa. Las bacterias ácido lácticas están representadas por lactobacilos que pueden ser homofermentativos y heterofermentativos, lactococos y leuconostoc. Las especies microbianas que más frecuentemente se aíslan de los gránulos de kefir se presentan en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Bacterias y levaduras encontradas en gránulos de kefir y leche fermentada.

Lactobacilos	
<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus kefirgranum</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus parakefir</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus viridescens</i>
Lactococos	
<i>Lactococcus lactis subesp. Lactis</i>	<i>Lactococcus lactis subesp. cremoris</i>
Streptococos	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	
Enterococos	
<i>Enterococcus durans</i>	

Leuconostoc	
<i>Leuconostoc sp.</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
Bacterias ácido acéticas	
<i>Acetobacter sp.</i>	<i>Acetobacter aceti</i>
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	
Otras bacterias	
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Levaduras	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Candida friedrichii</i>
<i>Saccharomyces sp.</i>	<i>Candida pseudotropicalis</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida tenuis</i>
<i>Saccharomyces unisporus</i>	<i>Candida inconspicua</i>
<i>Saccharomyces exiguous</i>	<i>Candida maris</i>
<i>Saccharomyces turicensis</i>	<i>Candida lambica</i>
<i>Saccharomyces delbrueckii</i>	<i>Candida tannotelerans</i>
<i>Saccharomyces dairensis</i>	<i>Candida valida</i>
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	<i>Candida kefir</i>
<i>Brettanomyces anomalus</i>	<i>Candida holmii</i>
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	<i>Pichia fermentans</i>

Adaptado de Farnworth E. R., 2005.

1.2.4 Elaboración de la leche fermentada

Para elaborar el kefir, se colocan 50 a 100 gramos de gránulos en 1 litro de leche fluida pasteurizada, en un recipiente de plástico o vidrio bien limpio y tapado. Se deja la leche con los gránulos a temperatura ambiente (preferentemente 20°C), durante 24-48 horas. Luego, se separan los gránulos de la leche con un colador de plástico obteniendo la leche fermentada que está lista consumir. Los gránulos recuperados se lavan solo con agua potable (a temperatura ambiente) y se utilizan para preparar leche fermentada nuevamente. Los gránulos de kefir aumentan de peso durante los sucesivos subcultivos en leche, debido al aumento de la biomasa de microorganismos, junto con un aumento de la cantidad de matriz. Los gránulos se conservan congelados a -20°C sumergidos en leche.

1.2.5 Características de la leche fermentada: cambios en macrocomponentes debido a la fermentación

Cuando se adicionan a la leche los gránulos de kefir los microorganismos presenten en el gránulo pasan a la leche. Tanto los microorganismos contenidos en la

matriz como los presenten en la leche, crecen produciendo distintos metabolitos entre los cuales se pueden mencionar ácidos láctico, acético, fórmico, pirúvico, CO₂ y etanol, que otorgan las características organolépticas al producto fermentado.

Durante la fermentación se generan además productos de degradación de la matriz alimentaria, como pueden ser ciertos péptidos, que poseen efectos benéficos sobre la salud del consumidor. Las bacterias lácticas poseen enzimas, peptidasas y proteinasas que son capaces de hidrolizar las proteínas del medio produciendo aminoácidos y péptidos necesarios para su óptimo desarrollo en medios como la leche (Séverin y Wenshui, 2005). Debido a la gran variedad de enzimas proteolíticas presentes en los distintos fermentos es posible considerar que se generan una gran variedad de péptidos que podrían tener actividad biológica. Varias bacterias aisladas de gránulos de kefir presentan un incremento en la actividad de proteasas, que aumentan la posibilidad de encontrar péptidos bioactivos en el kefir (Farnworth, 2005).

1.2.6 Fermentación de otros sustratos no lácteos por kefir

Los gránulos de kefir normalmente se utilizan para fermentar leche de diferentes mamíferos, entre ellas de vaca, cabra y oveja. Además los gránulos pueden fermentar sustitutos de la leche como leche de soja (Abraham y de Antoni, 1999; Liu y col., 2005), leche de coco, leche de nuez (Cui y col., 2013) y pulpa de cacao (Puerari y col., 2012).

Asimismo se ha encontrado que algunos de estos productos fermentados sobre sustratos no lácteos poseen actividad biológica. Se ha descrito que la leche de soja fermentada con gránulos de kefir presenta actividad antimutagénica evaluada mediante el ensayo de mutagenicidad sobre *Salmonella* y actividad antioxidante evaluada mediante la disminución de la peroxidación del ácido linoleico y la capacidad de captura de compuestos radicalarios (Liu y col., 2005).

1.3 Péptidos bioactivos obtenidos a partir de proteínas alimentarias

1.3.1 Péptidos bioactivos: definición

En los últimos años, se ha estudiado y comprobado que las proteínas alimentarias son una fuente importante de péptidos biológicamente activos. Los péptidos bioactivos se definen como fragmentos específicos de proteínas que tienen un impacto positivo sobre las funciones corporales beneficiando al organismo (Kitts y Weiler, 2003).

Se han encontrado péptidos bioactivos a partir de diversas fuentes proteicas siendo las más estudiadas los provenientes de leche, trigo, carne y soja (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Péptidos bioactivos derivados de alimentos.

Efecto	Alimento de origen	Origen del péptido
Antihipertensivo (Inhibidora de ACE)	Soja	Hidrolizados de proteína de soja
	Pescado	Hidrolizados de pasta de pescado
	Carne vacuna	Hidrolizados de proteína muscular
	Leche	-lactoalbúmina, -lactoglobulina, -, - y -caseínas
	Huevo	Ovotransferrina, ovoalbúmina
	Trigo	Gliadina
	Brócoli	Extracto de brócoli
Inmunomodulatorio	Arroz	Albúmina de arroz
	Huevo	Ovoalbúmina
	Leche	-lactoalbúmina, -, - y -caseínas
	Trigo	Gluten de trigo
Citomodulatorio	Leche	- y -caseínas
Agonista opioide	Trigo	Gluten de trigo
	Leche	-lactoalbúmina, -lactoglobulina, - y -caseínas
Antagonista opioide	Leche	Lactoferrina, -caseína
Antimicrobiano	Huevo	Ovotransferrina, lisozima
	Leche	Lactoferrina, -, - y -caseínas
Antitrombótico	Leche	-caseína
Quelante de minerales	Leche	-, -caseínas
Hipocolesterolémico	Soja	Glicinina
	Leche	-lactoglobulina
Antioxidante	Pescado	Músculo de sardina
	Trigo	Proteína de germen de trigo
	Leche	-lactoalbúmina, -lactoglobulina

Adaptado de Hartmann y Meisel, 2007.

1.3.2 Obtención de péptidos bioactivos

Los péptidos potencialmente activos que se encuentran encriptados en las proteínas alimentarias ejercerían su acción una vez liberados de las mismas. Los posibles mecanismos para liberarlos son:

- a) Hidrólisis con enzimas digestivas, durante la ingesta o in vitro,
- b) Hidrólisis con microorganismos proteolíticos (fermentaciones),
- c) Acción de enzimas proteolíticas derivadas de microorganismos o plantas.
- d) Combinación de métodos

1.3.3 Efectos sobre el organismo

Los péptidos bioactivos ejercen su efecto sobre los principales sistemas del organismo: cardiovascular, digestivo, inmune y neurológico. Para ser bioactivo un componente dietario debe impartir efectos biológicos medibles a un nivel fisiológicamente razonable. Además la bioactividad medida debe tener al menos el potencial suficiente para afectar la salud de una manera benéfica, excluyendo posibles daños para la misma, como por ejemplo toxicidad, alergenicidad y mutagenicidad. Otro punto importante sobre los péptidos bioactivos es que para que ejerzan su actividad tienen que alcanzar intactos el tejido diana en cuestión, es decir, ser resistentes durante la digestión del alimento. La mayoría de los péptidos con actividad biológica son cortos, de sólo 2-9 aminoácidos.

Los efectos positivos sobre la salud se manifiestan como actividades biológicas entre las que se pueden mencionar las actividades antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, antihipertensiva, inmunomodulatoria, entre otras (Tabla 1.3).

Tabla 1.3 Efectos de los péptidos bioactivos sobre los principales sistemas del organismo.

Sistema Cardiovascular	Sistema Nervioso	Sistema Gastrointestinal	Sistema Inmune
Antihipertensiva		Quelante de minerales	Inmunomodulatoria
Antitrombótica		Regulación del apetito	Citomodulatoria
Hipocolesterolémica		Antimicrobiana	
Antioxidante	Agonista/Antagonista opioide		

Adaptado de Korhonen y Pihlanto, 2006; Hartmann y Meisel, 2007.

- **Actividad antihipertensiva**

En los últimos años, algunas proteínas de los alimentos se han identificado como fuentes de péptidos inhibidores de la enzima ACE, impidiendo de esta manera la conversión de angiotensina I en angiotensina II, potente agonista vasoconstrictor (FitzGerald y col., 2004), lo que conduce al descenso de la presión arterial. Si bien se

han identificado varias fuentes proteicas, los péptidos derivados de las proteínas de la leche presentan potencia antihipertensiva moderada, menor que las drogas utilizadas con ese fin. Además debido a la incompleta biodisponibilidad de los péptidos tras la administración oral, es difícil predecir el efecto antihipertensivo in vivo sobre la base de la actividad inhibitoria medida in vitro, debido a que estos componentes deben ser absorbidos intactos en el intestino y llegar al sistema cardiovascular en forma activa. En este sentido, las propiedades estructurales de los mismos juegan un papel importante.

- **Actividad antioxidante**

El estrés oxidativo es otro de los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares. Las especies reactivas al oxígeno (ROS) pueden causar grandes daños a las macromoléculas biológicas como el ADN, las proteínas y los lípidos. El consumo de antioxidantes presentes en alimentos parece ofrecer mayores beneficios contra el estrés oxidativo (Fang y col., 2002). La actividad antioxidante se ha atribuido a ciertas secuencias de aminoácidos como altas cantidades de histidina y la presencia de aminoácidos hidrofóbicos (Suetsuna y col. 2000; Peña-Ramos y col., 2004). Se cree que la actividad antioxidante de los péptidos que contienen histidina está relacionada con la capacidad de este aminoácido a donar hidrógeno y con la capacidad quelante de iones metálicos del grupo imidazol. La hidrofobicidad de los péptidos parece ser un factor importante para su actividad antioxidante debido a la mayor accesibilidad a grupos hidrofóbicos, como los ácidos grasos lipofílicos (Chen y col., 1998).

- **Actividad inmunomoduladora**

Los péptidos inmunomoduladores modulan las funciones del sistema inmune ya sea activando la respuesta contra la presencia de microorganismo patógenos o evitando la respuesta inflamatoria. Su acción se evidencia mediante la medida de la proliferación de linfocitos, la actividad de las células NK (natural killer), la producción de anticuerpos y la regulación de la producción de citoquinas. Además, reducen la respuesta inflamatoria en reacciones alérgicas y modulan la inmunidad de mucosas.

- **Actividad antitrombótica**

Se considera trombosis a la coagulación intravascular que reduce u obtura la luz vascular con detención de la circulación, pudiendo generar isquemia o infarto de órganos. En la génesis de la trombosis, la formación del coágulo tiene lugar de un modo

similar a como ocurre para evitar o cesar la hemorragia en casos de disrupción vascular, en donde intervienen dos procesos relacionados entre sí: la formación de un agregado o trombo de plaquetas y la formación de fibrina.

La formación de fibras de fibrina o coagulación plasmática, consiste en la transformación del fibrinógeno, que es soluble, en una proteína insoluble a través de la acción de la trombina, una enzima proteolítica que se forma por activación de la protrombina. El fibrinógeno es una glucoproteína de peso molecular relativamente elevado. La transformación del fibrinógeno en fibrina se debe a la acción de la trombina, que libera de la molécula de fibrinógeno cuatro péptidos de bajo peso molecular llamados fibrinopéptidos A y B de las cadenas α y β respectivamente. Una vez liberados los fibrinopéptidos, el resto del fibrinógeno constituye el monómero de fibrina, que mediante uniones electrostáticas forma el polímero (Mateo y col., 2006).

Una vez formado el trombo existe un sistema fibrinolítico que tiene como objetivo la lisis de la fibrina depositada. Su componente principal es la plasmina, una serín-proteasa de 85 kDa que se encarga de degradar a la fibrina, al fibrinógeno y otros varios factores de la coagulación.

Algunos de los péptidos con actividad antitrombótica actúan como inhibidores específicos de la trombina. Entre los compuestos que se incluyen dentro de este grupo se encuentran la hirudina y algunos péptidos sintéticos (Szewczuk y col., 1992). Las hirudinas naturales son un conjunto de polipéptidos de una sola cadena, con diferentes aminoácidos en el extremo C-terminal, producidos por la sanguijuela (*Hirudo medicinalis*). También pueden ejercer acción inhibitoria al unirse a los sitios terminales de fibrinógeno impidiendo la polimerización de los monómeros de fibrina (Laudano y Doolittle, 1978).

- **Actividad antimicrobiana**

Se han encontrado péptidos con actividad antimicrobiana en todos los organismos vivos, tanto en microorganismos como en organismos pertenecientes a los reinos animal y vegetal. Estos péptidos tienen un amplio espectro de actividad, matando o neutralizando muchas bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, incluyendo algunas cepas resistentes a antibióticos, como también hongos, virus y parásitos (Hancock, 2001). Usualmente están constituidos por 12 a 50 residuos, y mientras difieren ampliamente en secuencia y estructura, comparten algunas características comunes como el hecho de ser policatiónicos (Stark y col., 2002). Cerca del 50% de sus

aminoácidos son hidrofóbicos y los péptidos son anfipáticos, es decir que en la secuencia se alternan sistemáticamente residuos hidrofóbicos y polares.

1.3.4 Péptidos bioactivos en amaranto

Existen numerosos trabajos que indican la presencia de péptidos bioactivos encriptados en proteínas de semillas de amaranto. Se utilizaron principalmente métodos enzimáticos para producir la hidrólisis de las proteínas y se pudo comprobar que la acción de alcalasa y la combinación de alcalasa y tripsina sobre aislados proteicos de amaranto permitió obtener péptidos con potencial actividad biológica. Entre las actividades biológicas encontradas se pueden mencionar: actividad antihipertensiva (Tovar-Pérez y col., 2009; Vecchi y Añón, 2009; Fritz y col., 2011), actividad antioxidante (Tironi y Añón, 2010; Orsini Delgado y col., 2011), actividad antifúngica (Lipkin y col., 2005; Rizzello y col., 2009).

Capítulo 2

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Generales

El objetivo general de este trabajo fue generar conocimientos que sirvan de base para desarrollar ingredientes biológicamente activos derivados de proteínas de amaranto mediante hidrólisis con microorganismos proteolíticos.

Se proponen estudiar dos actividades biológicas: actividad antitrombótica y actividad antimicrobiana.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtener proteínas hidrolizadas mediante el empleo de microorganismos. Evaluar el efecto de la microflora propia de la harina de amaranto y de la microflora de gránulos de kefir sobre las proteínas de amaranto. Evaluar el efecto de la temperatura sobre la hidrólisis de proteínas.
- Caracterizar los hidrolizados proteicos obtenidos tanto en aspectos estructurales como fisicoquímicos.
- Evaluar el efecto de los hidrolizados sobre el crecimiento de *E. coli*.
- Determinar la potencial actividad antitrombótica in vitro de los hidrolizados.

Capítulo 3

Materiales y Métodos

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestras y condiciones de cultivo

3.1.1 Harina de amaranto

Se utilizó harina obtenida a partir de semillas de *Amaranthus mantegazzianus*. La harina desgrasada fue obtenida a partir de suspensiones al 10% p/v en n-hexano bajo agitación continua durante 24 horas. Se filtró con embudo de Buchner y bomba de vacío, posteriormente se dejó secar al aire a temperatura ambiente y se almacenó a 4°C hasta su utilización. Se utilizó el método de Kjeldahl para determinar proteínas, el método indirecto para determinar humedad a 105°C, se cuantificaron cenizas en mufla, lípidos por el método de Soxhlet con eter etílico como solvente de extracción e hidratos de carbono totales por Fehling Causse Bonnans previa hidrólisis.

3.1.2 Cultivos iniciadores-Gránulos de kefir

Se utilizaron gránulos de kefir CIDCA AGK1 de origen Argentino. Los gránulos fueron mantenidos a -20°C y fueron reactivados mediante sucesivos repiques en leche fresca La Serenísima parcialmente descremada (Mastellone Hnos.) en una relación del 5% p/v. Luego de cada repique se incubó durante 48-72 horas a temperatura ambiente en un lugar seco y preferentemente con poca entrada de luz. Pasado dicho tiempo, la biomasa obtenida fue colada (siempre utilizando recipientes, coladores y cucharas de plástico, para evitar el contacto de los gránulos con material metálico) y se prosiguió con un nuevo repique (subcultivo). La producción de biomasa continuó por un periodo aproximado de 30 días.

3.1.3 Tratamiento de la harina con gránulos de kefir

Se utilizaron suspensiones de la harina desgrasada de amaranto en agua destilada de manera de obtener una concentración final de proteínas de 0,5% p/v. En algunos experimentos esta suspensión fue sometida a un tratamiento térmico en autoclave con calor húmedo a 121°C y 1 atmósfera de sobrepresión durante 15 min. Las suspensiones se adicionaron con gránulos de kefir y se incubaron a 20°C. Al inicio de los experimentos, los gránulos de kefir que se encontraban creciendo en leche, se filtraron utilizando un colador plástico para separarlos del sobrenadante, se lavaron con agua destilada, se secaron con papel absorbente y se inocularon en las suspensiones de harina desgrasada de amaranto a razón de 5 g de gránulos en 100 ml de suspensión. Los

cultivos se mantuvieron a una temperatura controlada de 20°C durante todo el experimento y se monitorearon cada 24 horas. Simultáneamente se utilizó como control la misma suspensión de harina de amaranto en agua sin el agregado de los gránulos.

3.2 Caracterización de las muestras

3.2.1 Caracterización microbiológica

3.2.1.1 Medios de cultivo y de dilución

Diluyente para recuentos

Se utilizó como diluyente solución de triptona 1 g/l esterilizada en autoclave a 121°C a 1 atm de sobrepresión durante 15 minutos.

Agar nutritivo

Este medio de cultivo se utilizó para el recuento de microorganismos heterótrofos totales. Su composición está dada por:

- triptona 10 g/l
- extracto de carne 5 g/l
- NaCl 5 g/l
- agar en polvo 15 g/l

Se esterilizó en autoclave a 121°C a 1 atm de sobrepresión durante 15 minutos.

El medio se plaqueó en condiciones de esterilidad en placas de Petri estériles.

Agar glucosa-cloranfenicol (YGC)

Este medio de cultivo selectivo se utilizó para el recuento de hongos y levaduras.

Su composición está dada por:

- glucosa 20 g/l
- extracto de carne 5 g/l
- cloranfenicol 0,1 g/l
- agar en polvo 15 g/l

Se esterilizó en autoclave a 121°C a 1 atm de sobrepresión durante 15 minutos.

El medio se plaqueó en condiciones de esterilidad en placas de Petri estériles.

3.2.1.2 Recuento de microorganismos

Se determinó el contenido de microorganismos viables totales, bacterias lácticas, hongos y levaduras en la harina desgrasada de amaranto por plaqueo de diluciones

seriadas 1/10 preparadas en triptona (1 g/l) en placas de agar nutritivo y agar YGC. Una vez realizada la siembra, las placas de Petri con medios Agar nutritivo y Agar glucosa-cloranfenicol se incubaron en estufa a 30°C durante 24 a 72 horas, o hasta observar desarrollo visible de colonias.

Los resultados fueron expresados como unidades formadoras de colonias (ufc)/g de harina de amaranto.

3.2.1.3 Tinción y observación microscópica

3.2.1.3.1 Tinción de Gram

Se realizó la tinción diferencial de Gram que permite distinguir los microorganismos en Gram (+) y Gram (-) debido a diferencias en la estructura y composición de la pared celular bacteriana. Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

- Solución de Cristal Violeta: 10 g/l
- Solución de Lugol: Iodo 10 g/l y KI 20 g/l
- Solución decolorante: 4 partes de etanol y 1 parte de acetona
- Solución de Safranina: 2,5 g/l

El procedimiento seguido para realizar la coloración de Gram consistió en colocar solución de Cristal Violeta sobre el extendido fijado dejando actuar 2 minutos. A continuación se realizaron dos agregados sucesivos de solución de Lugol durante 30 segundos cada uno. Posteriormente se realizó un lavado con agua. Luego se aplicó la solución decolorante dejándola actuar por 10 segundos seguido de un lavado con agua. Por último se agregó la solución de safranina que se dejó actuar durante 2 minutos.

3.2.1.3.2 Morfología microscópica de las colonias aisladas

La caracterización microscópica de las colonias se efectuó sobre colonias que fueron aisladas de los diferentes medios de cultivo.

Para realizar la observación microscópica de las colonias obtenidas en los diferentes medios de cultivo se tomó con un anillo estéril una porción de una colonia y se realizó un extendido sobre un portaobjetos, fijándolo a la llama. Posteriormente se realizó la coloración de Gram. Se observaron al microscopio óptico Leica DMLB con objetivo de inmersión. Para la obtención de imágenes se acopló una

cámara Leica DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Suiza). Las imágenes se tomaron con un aumento de 1000x.

3.2.2 Medida de pH

La medición del pH de los diferentes cultivos se realizó con un electrodo combinado de vidrio-calomel en un pHmetro pH 211 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments) previamente calibrado.

3.2.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se realizaron electroforesis desnaturalizantes en un sistema discontinuo tricina-SDS-PAGE en presencia de urea 6M para la separación de proteínas de bajo peso molecular (1-70 kDa) en presencia y ausencia de 2-mercaptoetanol (Schägger, 2006). El sistema discontinuo utilizado estuvo formado por tres geles con diferentes concentraciones de acrilamida+bisacrilamida (% T) y diferente concentración relativa de bisacrilamida (% C).

3.2.3.1 Reactivos

- solución AB3 (49,5% T, 3% C): acrilamida 48% p/v, bisacrilamida 1,5% p/v.
- solución AB6, (49,5% T, 6% C): acrilamida 46,5% p/v, bisacrilamida 3% p/v.
- persulfato de amonio al 10%. Concentración final de 0,075% v/v en el gel apilador, de 0,05% v/v en el gel espaciador y 0,03% v/v en el gel separador.
- N',N',N',N'tetrametiletilendiamina (TEMED): se agregó en la preparación de los distintos geles a una concentración final de 0,01% v/v.
- buffer de electrodo anódico: Tris-HCl 0,1M a pH 8,9.
- buffer de electrodo catódico: Tris 0,1M, tricina 0,1M, SDS 0,1% p/v a pH 8,25.
- buffer de gel: Tris-HCl 1M, SDS 0,1% p/v a pH 8,45.
- buffer de muestra: Tris-HCl 50mM, glicerol 12% p/v, SDS 4% p/v, Coomassie Blue G 0,01% p/v a pH 6,8; con o sin -mercaptoetanol (2-ME) 5% v/v, para obtener condiciones reductoras o no reductoras respectivamente.
- solución fijadora: metanol 50% v/v, ácido acético 10% v/v.
- solución colorante: Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0,192% p/v disuelto en agua/metanol/ácido acético (10:10:4).
- solución decolorante: ácido acético al 10% v/v.

3.2.3.2 Muestras

Las muestras para las electroforesis se prepararon a partir de alícuotas tomadas a diferentes tiempos durante la incubación de suspensión de la harina de amaranto inoculada con los gránulos de kefir y de sus respectivos controles. Se mezclaron volúmenes adecuados de cada una de las muestras con el volumen correspondiente de buffer de muestra. Se buscó obtener soluciones o dispersiones que contengan entre 2-10 μg proteína/ μl .

Para asegurar la acción del β -mercaptoetanol presente en el buffer de muestra, las dispersiones fueron calentadas a 100°C en baño maría durante 1 minuto.

Antes de sembrar las muestras en los geles de poliacrilamida, fueron centrifugadas a 10000g y a 15°C, durante 15 minutos. Posteriormente se sembraron a razón de 20-50 μg de proteína por calle.

3.2.3.3 Patrones

Se utilizaron diferentes patrones de masa molecular.

Los patrones de bajo peso molecular (LMW) marca GE Health Care, incluyen las siguientes proteínas:

- fosforilasa b	94 kDa
- seroalbúmina bovina	67 kDa
- ovoalbúmina	45 kDa
- anhidrasa carbónica	30 kDa
- inhibidor de tripsina	20,1 kDa
- β -lactoalbúmina	14,4 kDa

Los patrones de muy bajo peso molecular (VLMW) marca BIO-RAD, utilizados incluyen las siguientes proteínas:

- triosa-fosfato isomerasa	26,6 kDa
- mioglobina	16,95 kDa
- β -lactoalbúmina	14,4 kDa
- aprotinina	6,5 kDa
- cadena de insulina	3,5 kDa
- bacitracina	1,4 kDa

Las proteínas patrón se solubilizaron en buffer de muestra desnaturizante con β -mercaptoetanol y se sometieron al mismo tratamiento que las muestras.

3.2.3.4 Armado de los geles

Los geles se prepararon de modo de generar tres zonas de diferente concentración de acrilamida-bisacrilamida:

- Gel Apilador: 4% T, 3% C preparado con 0,0825 ml solución AB3/ml solución gel.
- Gel Espaciador: 10% T, 3% C preparado con 0,2 ml solución AB3/ml solución gel.
- Gel Separador: 16% T, 6% C preparado con 0,33 ml solución AB6/ml solución gel con el agregado de urea hasta concentración final 6M.

3.2.3.5 Desarrollo de los geles y condiciones de corrida

Las electroforesis tricina-SDS-PAGE y tricina-SDS-PAGE+2-ME se realizaron en miniplacas (10 cm x 7 cm x 1 mm) en un equipo BIO-RAD, modelo Mini-Protean II. Las corridas se iniciaron a 30 V, 60 mA hasta que la muestra atravesó completamente el gel apilador. Luego la diferencia de potencial se aumentó hasta 90 V, 60 mA hasta completar la longitud del gel. Se requirieron entre 3-4 horas para completar las corridas.

3.2.4.6 Fijación, coloración y decoloración

Una vez realizada la corrida, los geles fueron fijados con la solución correspondiente durante 40 minutos y luego coloreados con Coomassie Brilliant Blue R-250 durante 12 horas y finalmente decolorados durante 2 horas, con cambios de solvente cada 40 minutos.

3.2.3.7 Obtención de imágenes

Para procesar los geles, se obtuvieron las imágenes utilizando un scanner HP modelo G2710.

3.2.4 Determinación del contenido de Nitrógeno

3.2.4.1 Determinación del contenido de Nitrógeno Total

El contenido de Nitrógeno total, expresado como proteína, se determinó mediante el método de Kjeldahl (AOAC, 1984). Para convertir el nitrógeno en proteínas se utilizó como factor de conversión 5,85 g proteínas/g de nitrógeno, que es el más adecuado para las proteínas de amaranto (Paredes-López, 1994).

Reactivos

- H₂SO₄ solución comercial 96% p/p, densidad 1,835 g/ml
- K₂SO₄ anhidro + CuSO₄·5H₂O relación 10:1.
- NaOH 40% p/v
- H₃BO₃ 4% p/v
- H₂SO₄ 0,0201N
- Indicador de Mortimer: rojo de metilo 0,016% p/v; verde de bromocresol 0,083% p/v.

Procedimiento

Se colocó una cantidad adecuada de muestra en un balón de Kjeldahl, al que se le agregó una cucharada de té de la mezcla de catalizador junto con 10,0 ml de ácido sulfúrico comercial y plato poroso. Se conectó el balón a una trampa de agua y se calentó en un principio suavemente hasta que cesó el desprendimiento de espuma. Luego se calentó enérgicamente hasta completar la digestión, es decir hasta que no se observaron partículas carbonosas sin oxidar y hasta que el líquido adquirió un aspecto translúcido y de color azul-verdoso. Completada la digestión se agregó agua hasta la mitad del balón para diluir el ácido.

A continuación se procedió a neutralizar la muestra mediante el agregado de solución concentrada de hidróxido de sodio. Luego se conectó el balón a un refrigerante por medio de una trampa adecuada y se procedió a calentar. El destilado que contenía en amoníaco se recogió en un erlenmeyer conteniendo 50 ml de la solución de ácido bórico junto con unas gotas del indicador de Mortimer. A medida que el amoníaco destiló se produjo el viraje del indicador del naranja-rojizo al azul. Cuando se destilan entre 150 y 200 ml, se detiene el calentamiento.

El destilado se valoró con una solución de ácido sulfúrico de concentración conocida hasta viraje del indicador de Mortimer al color inicial naranja-rojizo.

Junto con las muestras se realizó un blanco de reactivos.

La expresión matemática utilizada para calcular el contenido de nitrógeno como proteína fue la siguiente:

$$\text{Proteína total (mg/ml)} = (V_{\text{muestra}} - V_{\text{blanco}}) \cdot N_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot 14 \cdot 5,85 \cdot 1/V_{\text{muestra}}$$

3.2.4.2 Determinación del contenido de Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (N-TCA)

Para determinar el contenido de Nitrógeno soluble en TCA las muestras se centrifugaron a 10000g durante 10 min. A continuación se realizó el agregado de ácido tricloroacético hasta una concentración final de 8% p/v, seguido de una centrifugación a 10000g durante 10 minutos. El N soluble en 8% p/v de TCA se determinó en el sobrenadante con el reactivo de Folin-Ciocalteu de acuerdo al método de Hull (Hull, 1947; Abraham y col., 1993). Se empleó L-tirosina para construir la curva de calibración en el intervalo de concentraciones 2-20 mg/100 ml. La absorbancia a 650 nm se midió en un espectrofotómetro Beckman DU 650.

3.3 Medida de las potenciales actividades biológicas

3.3.1 Preparación de las muestras

A partir de las muestras tomadas a distintos tiempo de los cultivos de harina desgrasada de amaranto inoculada con gránulos de kefir se procedió a su centrifugación a 10000 rpm y 10°C durante 20 minutos en una centrífuga Coulter Beckman Avanti J-25 utilizando un rotor JA14. Posteriormente se separaron los sobrenadantes; una parte se congeló a -20°C para su posterior uso en algunas determinaciones mientras que el material restante se llevó a -80°C para su posterior liofilización.

Para la utilización de las muestras liofilizadas se las resuspendió en buffer PBS a razón de 50 mg de sólidos/ml.

3.3.2 Determinación del contenido de proteínas en los extractos

Para determinar el contenido de Nitrógeno como proteína en los sobrenadantes de los cultivos y en las dispersiones de los liofilizados en buffer PBS se centrifugaron las muestras a 10000g durante 10 minutos. El contenido de proteína de los sobrenadantes se determinó utilizando el método de Hull (Hull, 1947). Se empleó albúmina de suero bovino (BSA), provista por Sigma, para construir la curva de calibración. La absorbancia a 650 nm se midió en un lector de ELISA (SLT Rainbow).

3.3.3 Actividad antimicrobiana

3.3.3.1 Prueba de difusión en agar

Se determinó la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas a través del método de difusión en agar, utilizando sobrenadantes libres de células bacterianas. Los

sobrenadantes libres de células se obtuvieron por centrifugación a 10000 g durante 10 min a temperatura ambiente y fueron esterilizados por calor húmedo, en autoclave a 121° C y 1 atm de sobrepresión. Se utilizaron placas de agar nutritivo. Para la preparación del inóculo se utilizó un cultivo overnight de *E. coli* a partir del cual se preparó una suspensión en agua peptona al 0,1% ajustando la turbidez al 0,5 de la escala de Mc Farland (D.O. = 0,1). Para inocular el medio se realizó un hisopado en la superficie del agar en tres direcciones. A continuación, sobre el agar con el inóculo se realizaron fosas de 5 mm de diámetro, en las cuales se depositaron 20 µl de los sobrenadantes neutralizados y en diferentes concentraciones. Las placas fueron incubadas a 37° C por 24 a 48 h. Luego de la incubación se observó la presencia de halos de inhibición, midiéndose el diámetro de los mismos.

3.3.3.2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

La actividad antimicrobiana fue ensayada contra *E. coli* de acuerdo al método de microdilución (Gudiña y col., 2010) en placas plásticas estériles de 96 pocillos, fondo plano.

Muestras

Se utilizaron las muestras liofilizadas correspondientes a los cultivos de harina desgrasada de amaranto esterilizada y posteriormente inoculada con gránulos de kefir que fueron resuspendidas en buffer PBS. Estos extractos se centrifugaron a 10000g durante 10 minutos; los sobrenadantes se esterilizaron mediante filtración por membrana de nylon de 0,22 µm de diámetro de poro.

Desarrollo

En la microplaca se distribuyeron 125 µl de caldo nutritivo 2x en los pocillos de la primera columna, mientras que los pocillos de las columnas 2 a 10 fueron llenados con 125 µl de caldo nutritivo de concentración simple. A continuación se agregaron 125 µl de cada una de las muestras a los pocillos de la primera columna. Diluciones en serie de esta mezcla fueron realizadas por transferencia de 125 µl de la misma al pocillo siguiente, descartando 125 µl de la mezcla del pocillo de la columna 10, de forma que el volumen remanente en todos los pocillos fuera igual a 125 µl. Este proceso resulta en diluciones seriadas 1/2 de las soluciones de los extractos en las primeras 10 columnas de la microplaca. Finalmente todos los pocillos fueron inoculados con 2,5 µl de una

suspensión de *E. coli* en caldo nutritivo ajustada al 0,5 de la escala de Mc Farland (D.O. = 0,1), preparada a partir de un cultivo de 16 horas. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado. Se incluyeron controles de esterilidad de las muestras, del caldo nutritivo, así como también de la viabilidad de los microorganismos. Se realizó una lectura de la densidad óptica a 600 nm de la microplaca inmediatamente después del llenado de los pocillos y luego de 24 horas de incubación de la misma a 37°C, utilizando un lector de ELISA (SLT Rainbow).

El porcentaje de inhibición del crecimiento fue calculado de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{inhibición} = [1 - (\text{DO}_c / \text{DO}_0)] \times 100$$

donde DO_c representa la densidad óptica a 600 nm del pocillo correspondiente al extracto de péptidos de concentración igual a C, y DO_0 , la densidad óptica a 600 nm del pocillo correspondiente al control de crecimiento del microorganismo en ausencia de péptidos.

La concentración inhibitoria mínima (CIM) para *E. coli* fue definida como la mínima concentración de péptidos que inhibe completamente el crecimiento medible ($\text{DO}_{600} = 0$ que se corresponde con un %inhibición mayor al 95%).

3.3.4 Actividad antitrombótica in vitro

Reactivos

- Fibrinógeno bovino: se preparó una solución 0,1% p/v de fibrinógeno provisto por Sigma en un buffer Tris-HCl 0,05M, pH 7,2 con NaCl 0,12mM.
- Trombina humana: a partir de trombina sólida de marca comercial Sigma 330 UI se preparó una solución 12 UI/ml en buffer Tris-HCl 0,05M, pH 7,2 con NaCl 0,12mM.
- Citrato de sodio 20mM, pH 3.

Muestras

Se prepararon diluciones en buffer Tris-HCl 0,05M, pH 7,2 con NaCl 0,12mM a partir de los extractos preparados por disolución de los liofilizados en buffer PBS.

Desarrollo

El método se desarrolló en microplacas (Yang y col., 2006; Zhang y col., 2008). Las soluciones se preincubaron a 37°C en cada pocillo se colocaron 140 µl de la solución de fibrinógeno y luego se adicionaron 40 µl de cada muestra, preparando un control positivo de inhibición de la coagulación utilizando citrato de sodio y un control negativo (coagulación total) utilizando buffer. La microplaca se agitó convenientemente y se realizó la primera medida de absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA (SLT Rainbow) obteniéndose los valores de muestra blanco y control blanco. A cada pocillo se le adicionó posteriormente 10 µl de la solución de trombina para iniciar la reacción de coagulación. La microplaca se incubó durante 10 minutos a 37°C y se realizó nuevamente la medida de la absorbancia a 405 nm, obteniéndose los valores de las muestras, el control negativo y el control positivo. Todas las medidas se realizaron por duplicado.

Los efectos inhibitorios de la coagulación se calcularon según la siguiente expresión:

$$\% \text{inhibición} = [(CB-C) - (MB-M)] \times 100 / (CB-C)$$

Donde:

CB: control blanco (absorbancia inicial del control negativo de inhibición).

C: control (absorbancia a los 10 min. del control negativo de inhibición).

MB: muestra blanco (absorbancia inicial de las muestras).

M: muestra (absorbancia a los 10 min. del control negativo de inhibición).

3.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANAVA). Para estudiar las diferencias entre valores obtenidos se realizó la comparación de medias mediante la prueba de LSD de Fisher (Fisher, 1954) con un nivel de significación = 0,05.

Capítulo 4

Resultados y Discusión

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Características químicas de la harina de amaranto

Para realizar las suspensiones de harina de amaranto se utilizó una harina elaborada a partir de las semillas según se detalló en materiales y métodos. La composición de la harina utilizada fue la siguiente (en % p/p, base húmeda):

- proteínas $18,6 \pm 1$
- hidratos de carbono $52,3 \pm 0,3$
- lípidos $10,3 \pm 0,5$
- cenizas $4,6 \pm 0,05$
- humedad $9,2 \pm 0,2$

Esta harina, previamente desgrasada, se utilizó para preparar las suspensiones de trabajo en agua. La composición de la harina desgrasada fue la siguiente (% p/p, base húmeda).

- proteínas 20,7
- hidratos de carbono 58,3
- cenizas 5,1
- humedad 10,3

4.2 Caracterización de la suspensión de harina desgrasada de amaranto

En una primera etapa se evaluó el efecto de la incubación de la suspensión de harina desgrasada de amaranto en agua. Se determinó el cambio de pH de la suspensión en función del tiempo de incubación. Los resultados se muestran en la Figura 4.1.

Del análisis de la Figura 4.1 se desprende que el pH de la suspensión tuvo un descenso sostenido en el tiempo alcanzándose valores por debajo de 3,5 unidades de pH. Estos resultados sugieren que en la suspensión de harina desgrasada se encuentran presentes microorganismos capaces de utilizar los componentes de esta dispersión como sustrato y reducir el pH.

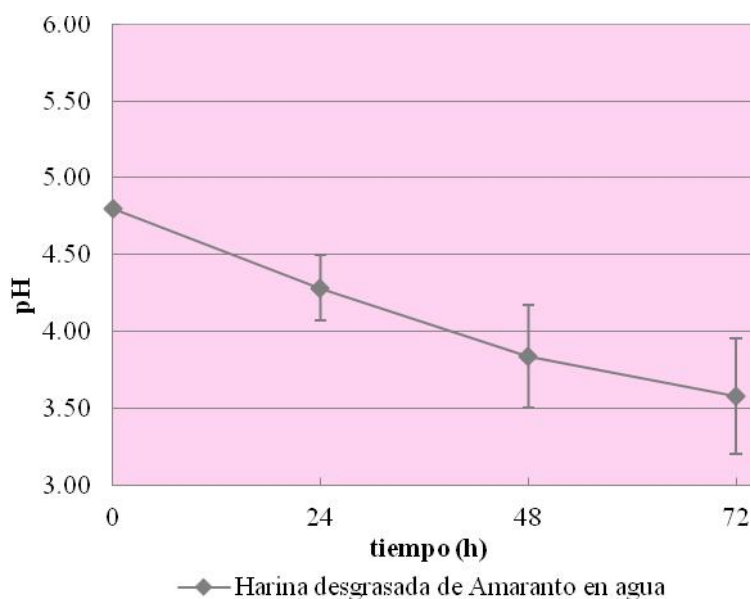


Figura 4.1 Evolución del pH de las suspensiones de harina desgrasada de amaranto en agua en función del tiempo de incubación a 20°C.

Por ello se estudiaron las características microbiológicas de la suspensión de harina de amaranto. Se realizó el recuento de microorganismos heterótrofos totales en medio agar nutritivo, y hongos y levaduras en medio YGC de una suspensión de harina desgrasada de amaranto en agua. Los resultados se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Recuento de microorganismos en la harina desgrasada de amaranto.

Tipo de microorganismos	UFC/g
Mesófilos Totales	$6,66 \times 10^6$
Hongos y levaduras	$2,00 \times 10^4$

Del análisis de los resultados mostrados en la Tabla 4.1 se puede ver que los hongos y levaduras solo representan el 1 % de la población total.

En el Código Alimentario Argentino no se registran exigencias microbiológicas para una harina de este tipo, sólo se encuentran exigencias para harinas tostadas. Las harinas no se encuentran dentro del grupo de alimentos que deben estar sujetos a controles microbiológicos de forma obligatoria, según consta en el Código Alimentario Argentino (Art. 156 bis).

También se realizó una comparación de los microorganismos presentes al inicio y luego de 72 h de incubación de las suspensiones de harina de amaranto en agua para

evaluar la posible evolución de la población de microorganismos presentes en este sistema (Figura 4.2).

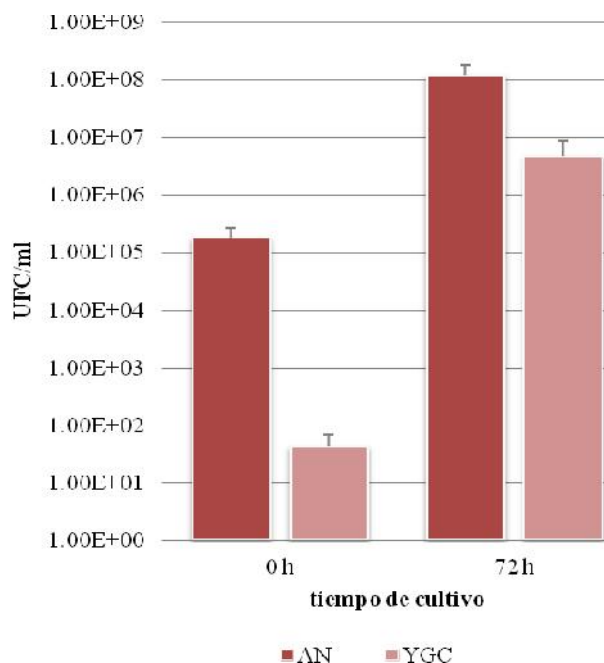


Figura 4.2 Recuento de bacterias, hongos y levaduras viables en la suspensión de harina desgrasada de amaranto en agua correspondientes a tiempos 0 y 72 h de iniciada la experiencia.

Las respectivas placas se incubaron durante 24-48 h en estufa a 30°C.

En la Figura 4.2 se observa que hay un incremento en el número de microorganismos presente en la suspensión de harina después de 72 h de incubación. Los microorganismos totales se incrementan aproximadamente en 3 órdenes de magnitud, mientras que el incremento en el recuento de hongos y levaduras fue mayor, más de 5 órdenes de magnitud.

En las Figuras 4.3 y 4.4 se muestran las fotografías de las placas de cultivo en agar YGC a tiempos 0 y 72 h respectivamente, donde se evidencia un cambio en la morfología macroscópica de las colonias. Además se presentan imágenes de la microscopía de los extendidos de algunas de las colonias teñidas mediante la coloración de Gram.

En la Figura 4.3 a) y b) se muestran las colonias que crecieron en agar YGC correspondientes a tiempo 0 h. Se puede apreciar la presencia de hongos y colonias levaduriformes, siendo los primeros los que se encontraron en mayor proporción. Se prestó especial atención a las colonias levaduriformes a partir de las cuales se realizaron extendidos que se tiñeron mediante la coloración de Gram para observar su morfología

microscópica con un aumento de 1000 x. La Figura 4.3 c) muestra unas levaduras redondas a ligeramente ovaladas que en la observación macroscópica se correspondieron con colonias redondas, de borde liso, de color blanco, opacas y con consistencia cremosa.

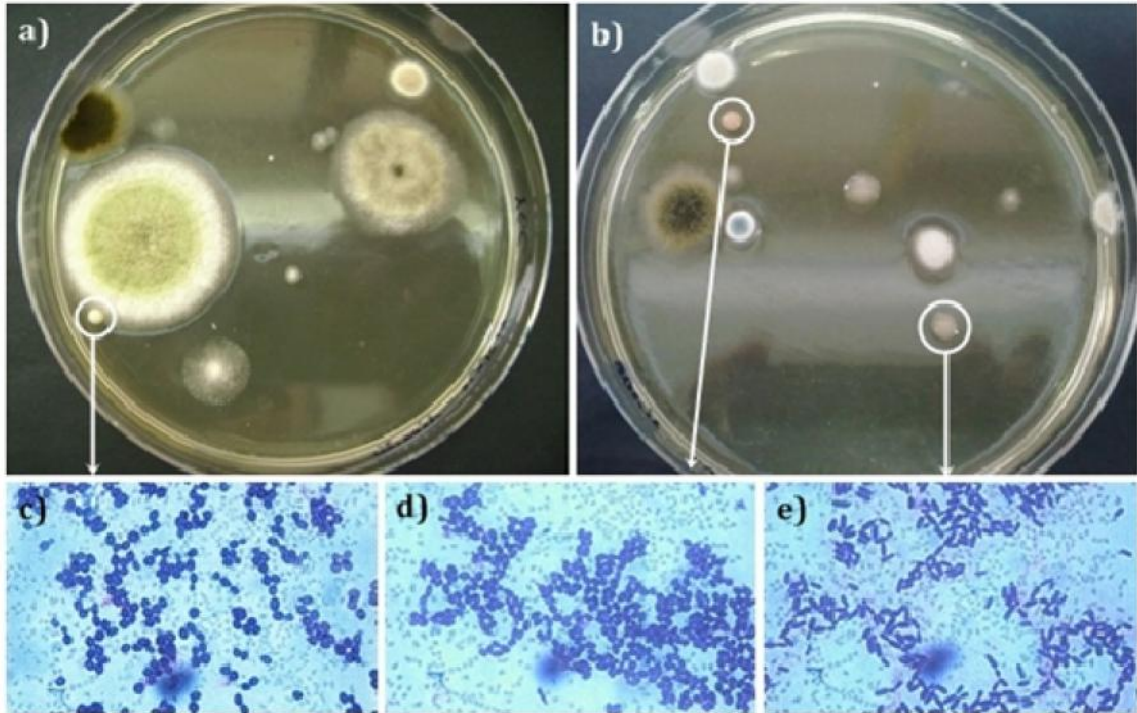


Figura 4.3 a) y b) Fotografías de placas de agar YGC correspondientes a la dilución (-1) y a tiempo 0 h.
c), d) y e) Fotografías de extendidos de colonias seleccionadas con tinción de Gram, aumento 1000x.

En la Figura 4.3 d) se observó la presencia de levaduras ligeramente ovaladas y de un tamaño menor a las de la Figura 4.3 c) que corresponden a colonias redondas, de borde liso, con el centro elevado y pigmentación rosa claro. Por último, las colonias redondas, de borde liso, con un color blanquecino a transparente, brillosas y con consistencia pegajosa se correspondieron a levaduras de forma alargada (Figura 4.3 e).

Los cultivos de 72 h presentaron un aumento de la cantidad de colonias de levaduras con respecto de la cantidad de hongos (Figura 4.4), es probable que este hecho se haya debido a la disminución del pH en el medio que inhibió el crecimiento de hongos, mientras que permitió el desarrollo de las levaduras.

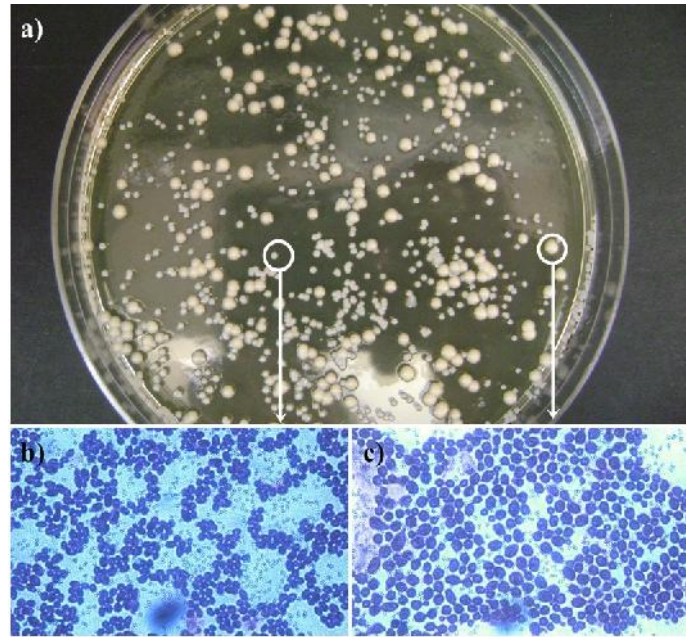


Figura 4.4 a) Fotografía de placa de agar YGC correspondientes a la dilución (-4) y a tiempo 72 h. b) y c) Fotografías de extendidos de colonias seleccionadas con tinción de Gram, aumento 1000x.

Al inicio de la incubación, en las placas de agar YGC se observaron mayoritariamente colonias que parecen corresponder a hongos (Figura 4.3), mientras que a las 72 h de cultivo se observó un cambio de la población hacia la presencia de levaduras (Figura 4.4).

Los resultados de los recuentos en agar nutritivo de la suspensión de harina desgrasada se muestran en la Figura 4.5 h. A partir de las colonias que crecieron en agar nutritivo se realizaron extendidos a los que se les realizó la coloración de Gram. Al analizar la observación microscópica (aumento 1000x) se observaron tanto bacilos Gram positivos como Gram negativos. También se observaron cocos Gram positivos.

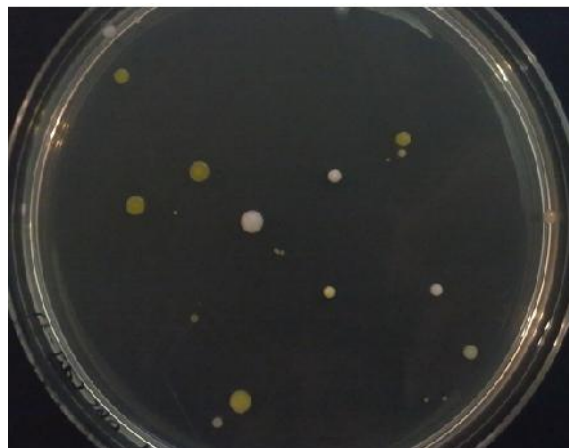


Figura 4.5 Placa de agar nutritivo correspondiente a las 0 h y dilución (-3).

En las placas de agar nutritivo a las 72 h de cultivo (Figura 4.6) se observó la presencia de colonias que correspondieron a cocos Gram positivos (Figura 4.6 e), bacilos cortos Gram negativos (Figura 4.6 b, d) y también se encontró la presencia de levaduras (Figura 4.6 c).

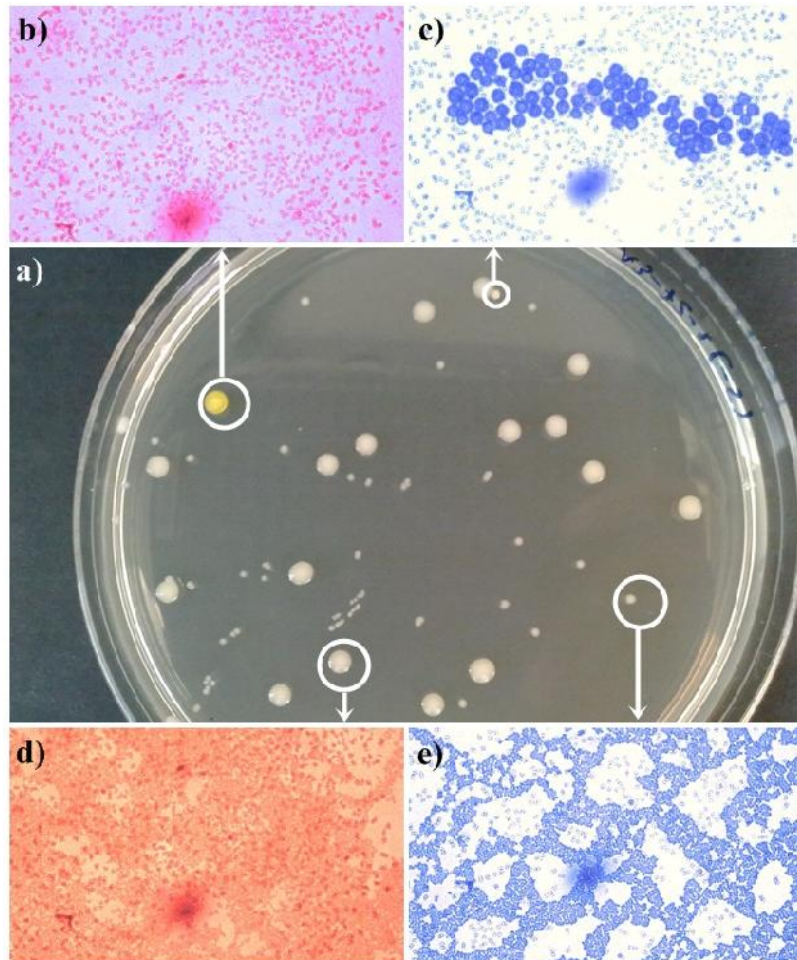


Figura 4.6 a) Fotografía de la placa de agar nutritivo correspondiente a la dilución (10^{-6}) y a tiempo 72 h. b), c), d) y e) Fotografías de extendidos de colonias seleccionadas con tinción de Gram, aumento 1000x.

4.3 Evaluación de la hidrólisis de las proteínas de las suspensiones de harina desgrasada de amaranto durante la incubación

Con el fin de conocer si durante la incubación se producían cambios a nivel de las proteínas por acción de la microbiota propia de la harina se analizaron los perfiles proteicos y se cuantificó el contenido de nitrógeno TCA soluble.

Los perfiles electroforéticos se analizaron en el sistema de electroforesis conteniendo tricina y urea, que permite separar péptidos de bajo peso molecular, en presencia y ausencia de 2-mercaptoetanol (Figura 4.7).

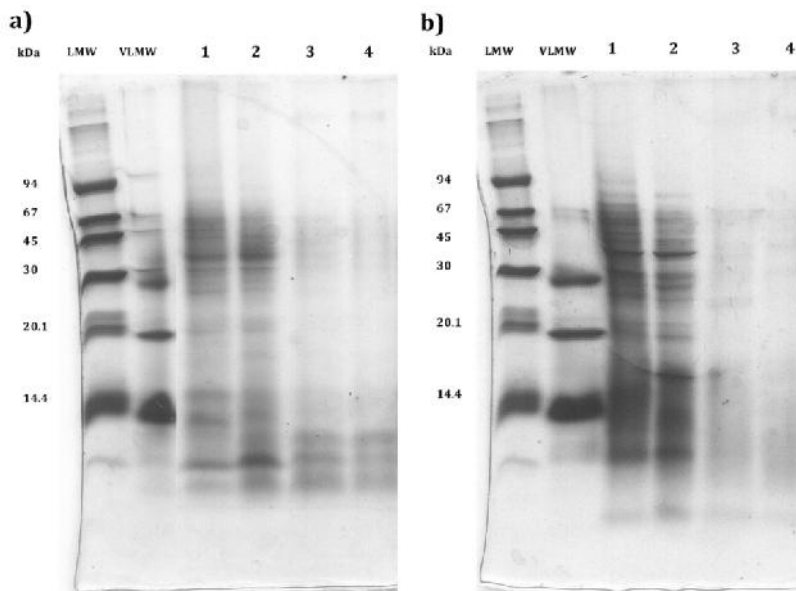


Figura 4.7 Perfiles electroforéticos en geles de tricina-SDS-PAGE con urea 6 M de las suspensiones de harina desgrasada de amaranto en agua. a) sin 2-ME, b) con 2-ME. LMW: patrones de bajo peso molecular; VLMW: patrones de muy bajo peso molecular. Calles 1 a 4: muestras a tiempos 0, 24, 48 y 72 h respectivamente.

En la calle 1 de la Figura 4.7 a) correspondiente a la suspensión de harina de amaranto a tiempo 0 h se observan algunas bandas intensas entre las que se destacan un conjunto de bandas de aproximadamente 54-56 kDa correspondientes a subunidades diméricas de globulina 11S y a un polipéptido característico de la globulina P, respectivamente. También se observan varias bandas alrededor de 30 kDa que pueden provenir de la fracción albúminas o de polipéptidos pertenecientes a las globulinas 7S y 11S. Aunque la globulina 11S está formada por polipéptidos ácidos y básicos unidos por enlaces puente disulfuro, algunos de estos pueden encontrarse libres en bajas concentraciones en la harina de amaranto. A medida que aumenta el tiempo de incubación se observa que la intensidad de las bandas de PM 54-56 y 30 kDa disminuye mientras aumenta la intensidad de algunas bandas de PM menor a 14,4 kDa.

En la Figura 4.7 b) se observan los perfiles obtenidos en condiciones desnaturalizantes-reductoras. La calle 1 sembrada con la suspensión de harina de amaranto a tiempo 0 h presentó bandas intensas que se corresponden con polipéptidos

monoméricos de alrededor de 54 kDa de la globulina P, de 33 y 20 kDa provenientes de la globulina 11S (Martínez y col., 1997). También se observan abundantes bandas de PM menores a 14,4 kDa que pueden asociarse a la fracción albúminas. Cuando el tiempo de incubación aumenta, los perfiles se vuelven más tenues, indicando que los mismos péptidos son sustrato de los microorganismos presentes en la harina. Los péptidos más pequeños originados podrían no observarse en el gel por dos razones: o bien son demasiado pequeños y escapan del gel, o bien no logran fijar una cantidad de colorante que los haga visibles.

Asimismo, cuando se analiza el contenido de nitrógeno TCA soluble en función del tiempo (Figura 4.8) se encuentra que los péptidos solubles aumentan en forma progresiva hasta las 48 h, manteniéndose constante hasta las 72 h, hecho que puede correlacionarse con la pérdida de intensidad observada en los geles de tricina-SDS-PAGE a partir de las 48 h correspondiente a las bandas de PM mayor a 30 kDa (Figura 4.7 a) calles 3 y 4).

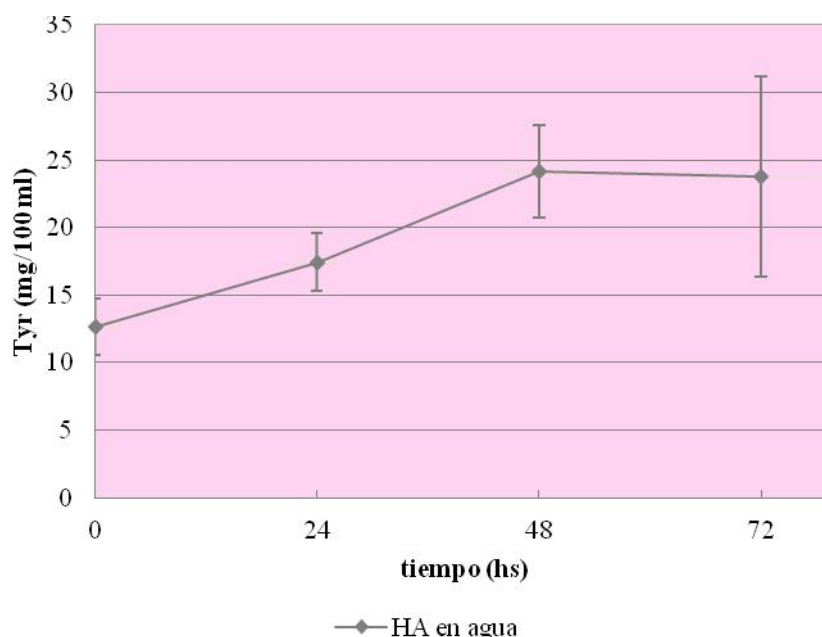


Figura 4.8 Contenido de nitrógeno soluble en TCA al 8 %p/v, expresado como mg Tyr/100 ml de suspensión, en función del tiempo de incubación.

Si bien en los perfiles electroforéticos se observa una disminución de la intensidad de las bandas con el paso del tiempo, cuando analizamos el contenido de nitrógeno TCA soluble observamos un aumento en la concentración, lo que nos estaría indicando que el contenido de péptidos efectivamente aumenta con el paso del tiempo.

4.4 Suspensión de harina desgrasada de amaranto en agua con el agregado de gránulos de kefir

A las suspensiones de harina de amaranto desgrasada en agua se le adicionaron gránulos de kefir a fin de evaluar los cambios que estos microorganismos podrían efectuar en dicho sustrato. Dado que la harina presenta una carga microbiana alta, se realizaron dos ensayos: uno utilizando la suspensión de harinas tal como se describió previamente y otro utilizando la misma suspensión esterilizada en autoclave a 121°C previo al agregado de los gránulos.

4.4.1 Fermentación de la harina desgrasada de amaranto con gránulos de kefir

A la suspensión de harina de amaranto se le adicionaron gránulos de kefir al 5 % y se incubó a 20°C. Se realizó el seguimiento del pH de la suspensión en función del tiempo de incubación (Figura 4.9).

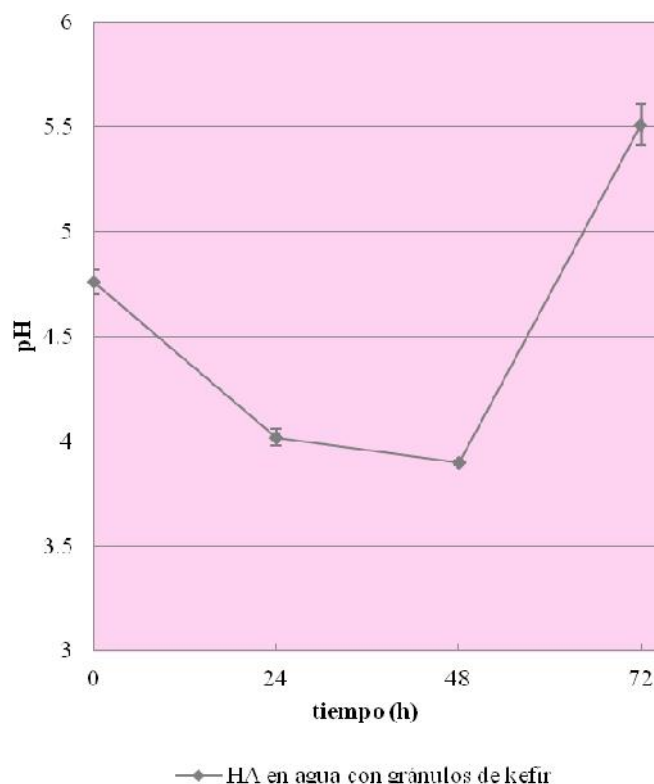


Figura 4.9. Evolución del pH de las suspensiones de harina desgrasada de amaranto en agua inoculada con gránulos de kefir en función del tiempo de incubación.

Del análisis de la Figura 4.9 surge que durante las primeras 48 h de incubación se produjo una disminución del pH hacia valores próximos a 4 y que a las 72 h se

produjo un aumento del pH. Este aumento del pH puede estar relacionado a la deaminación de algunos aminoácidos producto del metabolismo de los microorganismos aportados por los gránulos de kefir o a la combinación con la microflora de la harina, ya que este aumento no se observó al incubar la suspensión de harina sin los gránulos (Figura 4.1).

El mismo ensayo se realizó utilizando la suspensión de harina desgrasada esterilizada. En la Figura 4.10 se puede observar la variación del pH de la suspensión de harina de amaranto esterilizada fermentada con gránulos de kefir en función del tiempo, se incluye también la variación de pH observada en una suspensión esterilizada de harina de amaranto sin gránulos de kefir que se tomó como control para analizar los resultados obtenidos.

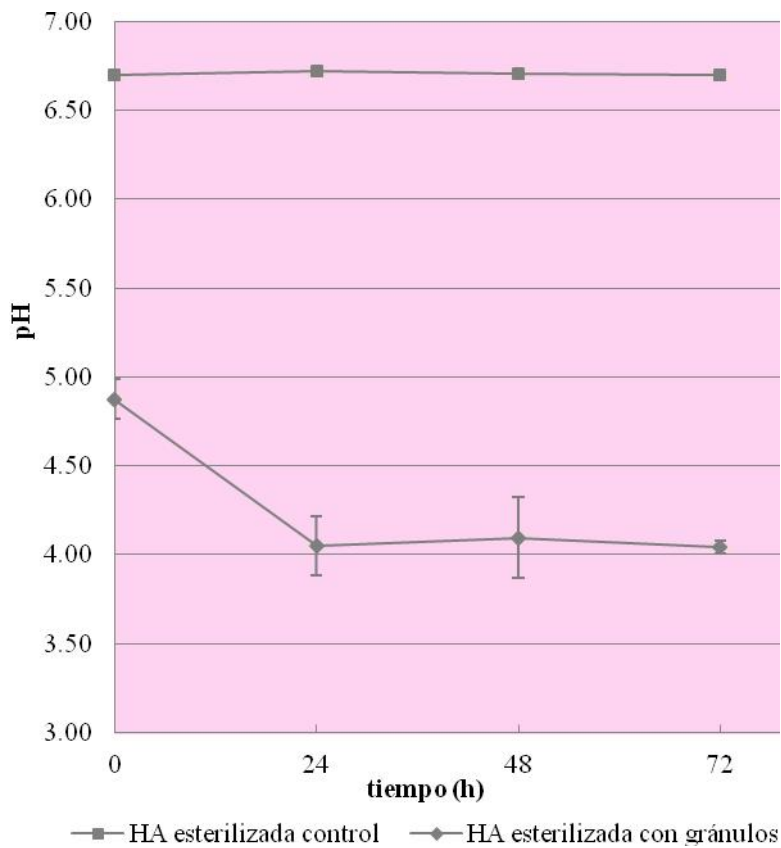


Figura 4.10 Cinética de pH en las suspensiones de harina de amaranto esterilizada con y sin el agregado de gránulos de kefir.

A partir de los datos de la Figura 4.10 se puede ver que el agregado de los gránulos de kefir produjo un descenso inicial de pH de aproximadamente 1,5 unidades, con respecto a la suspensión tomada como control, que se observa a tiempo 0 h.

Además se observó que la suspensión inoculada con gránulos de kefir sufrió un descenso de pH a las 24 h, que se mantuvo hasta las 72 h de incubación.

Si se comparan las Figuras 4.9 y 4.10 únicamente se observan diferencias en el pH a las 72 h de cultivo. El aumento en el pH observado en el caso de la suspensión de harina de amaranto fermentada con gránulos de kefir respecto a la suspensión de harina esterilizada y fermentada con gránulos, podría atribuirse a la interacción entre la microflora de la harina y la de los gránulos de kefir. Una posible hipótesis sería que, ante un aumento en la cantidad de microorganismos presentes en el sistema (suspensión de harina de amaranto sin esterilizar inoculada con gránulos de kefir), se requiera una mayor cantidad de fuente de carbono para abastecerlos, por lo cual comenzarían a utilizar algunos aminoácidos liberando grupos amino, posibles responsables del aumento de pH observado.

4.4.2 Evaluación de la hidrólisis de las proteínas de las suspensiones de harina desgrasada de amaranto durante la incubación

Los perfiles proteicos obtenidos a partir de las suspensiones de harina desgrasada sin tratamiento térmico fermentada con gránulos de kefir se presentan en la Figura 4.11.

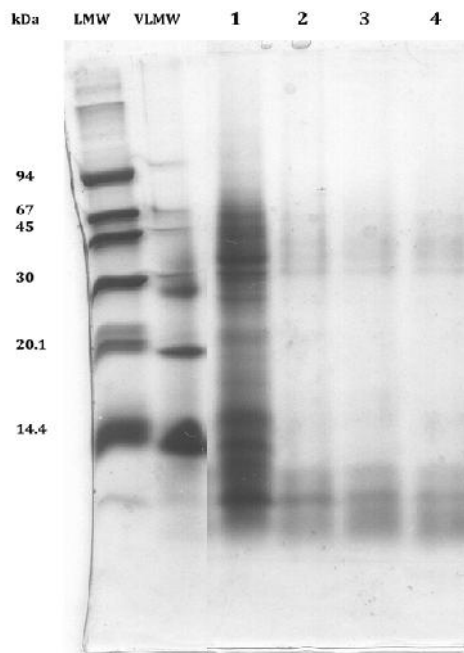


Figura 4.11 Perfiles electroforéticos en Geles de tricina-SDS-PAGE con urea 6 M, de las suspensiones de harina desgrasada de amaranto en agua con el agregado de gránulos de kefir sin 2-ME.

LMW: patrones de bajo peso molecular; VLMW: patrones de muy bajo peso molecular.

Calles 1 a 4: muestras a tiempos 0, 24, 48 y 72 h respectivamente.

Los perfiles electroforéticos obtenidos permiten caracterizar los polipéptidos generados por la acción conjunta de los microorganismos presentes en la harina de amaranto y los aportados por los gránulos de kefir.

En la Figura 4.11 se observa en la calle 1 un perfil idéntico al descrito en la Figura 4.7 a). A tiempo 0 h (calle 1) se observa entre otras, la presencia de bandas intensas que se corresponden con polipéptidos monoméricos de alrededor de 54 kDa de globulina P, de 33 y 20 kDa provenientes de la globulina 11S y otras bandas de PM menor a 20 kDa correspondientes a la fracción albúmina. A partir de las 24 h se observa una disminución en la intensidad de las bandas de PM mayores a 14,4 kDa, sólo se observan bandas de muy baja intensidad de PM entre 45-30 kDa y otras bandas de mayor intensidad por debajo de los 14,4 kDa.

En la Figura 4.12 se muestra la evolución del contenido de N-TCA soluble de las suspensiones de harina fermentadas.

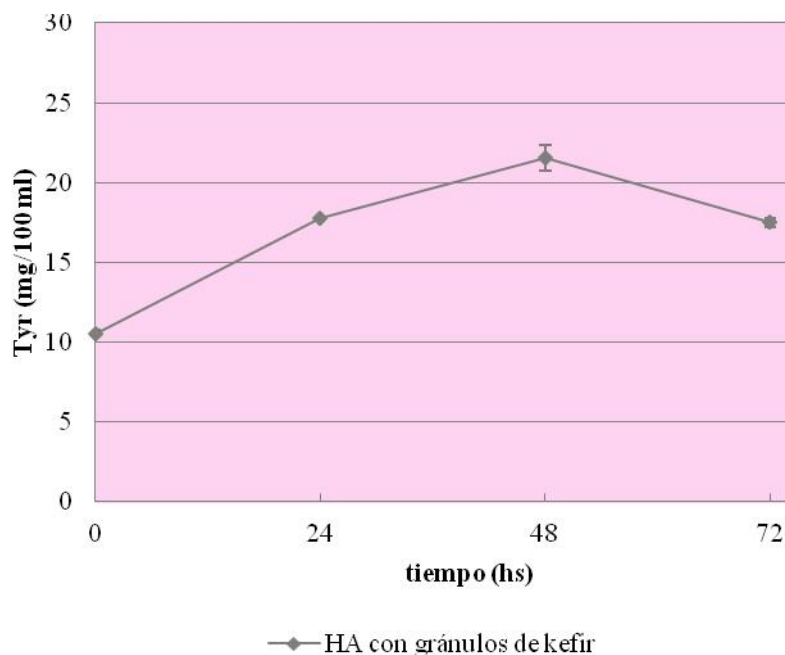


Figura 4.12 Contenido de nitrógeno soluble en TCA al 8 %p/v en las suspensiones de harina desgrasada de amaranto con gránulos de kefir, expresado como mg Tyr/100 ml de suspensión, en función del tiempo de incubación.

Del análisis de la Figura 4.12 también se puede ver que durante las primeras 48 h de cultivo se produce un aumento en el contenido de nitrógeno TCA soluble, hecho que se puede relacionar con la pérdida de intensidad de algunas bandas en los geles de tricina-SDS-PAGE de la Figura 4.11 a) calles 2, 3 y 4.

Los resultados obtenidos con las suspensiones de harina desgrasada esterilizada fermentada con los gránulos de kefir se muestran en la Figura 4.13. En este ensayo se evalúa el efecto proteolítico de los microorganismos contenidos en los gránulos de kefir sobre las proteínas de amaranto.

En la Figura 4.13 se observa en la calle 1 un perfil similar a los mostrados en las Figuras 4.7 y 4.11. A las 24 h se observa la desaparición de una banda de PM aproximadamente 20 kDa (calle 2) mientras que el resto de las bandas disminuye en intensidad con el paso del tiempo. A las 72 h prácticamente no se observan bandas.

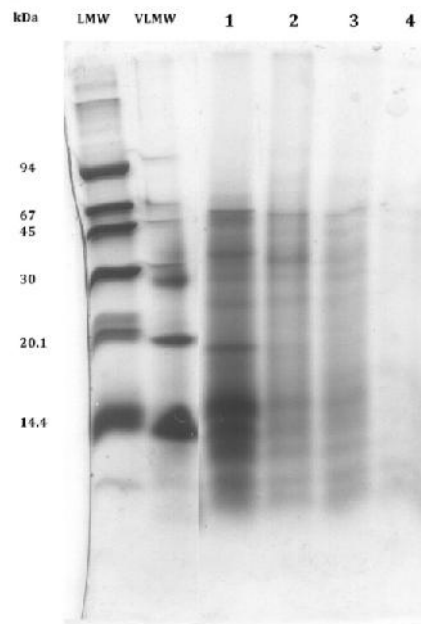


Figura 4.13 Perfiles electroforéticos en geles de tricina-SDS-PAGE con urea 6 M, de las suspensiones esterilizadas de harina desgrasada de amaranto en agua con gránulos de kefir en ausencia de 2-ME.

LMW: patrones de bajo peso molecular; VLMW: patrones de muy bajo peso molecular.

Calles 1 a 4: muestras a tiempos 0, 24, 48 y 72 h respectivamente.

Analizando el efecto de la microflora de la harina de amaranto y de los gránulos de kefir sobre la hidrólisis de proteínas en los perfiles de geles de tricina-SDS-PAGE se observa que la microflora de los gránulos de kefir es la que más lentamente degrada las proteínas ya que la disminución significativa de bandas en los perfiles se observó recién a las 72 h de incubación (Figura 4.13). Por otro lado, la microflora de la harina de amaranto produjo la disminución en la intensidad de las bandas a las 48 h de incubación (Figura 4.7) mientras que la acción conjunta de ambas microfloras la produce a las 24 h de iniciado el cultivo (Figura 4.11).

Por otro lado, se analizó el contenido de nitrógeno soluble en TCA al 8 % como parámetro indicador de la proteólisis producida. En la Figura 4.14 se muestra el

contenido de nitrógeno soluble, expresado como mg Tyr/100 ml, en función del tiempo. El contenido de nitrógeno TCA-soluble se mantuvo prácticamente constante hasta las 48 h y posteriormente se observó un ligero aumento hacia las 72 h de incubación.

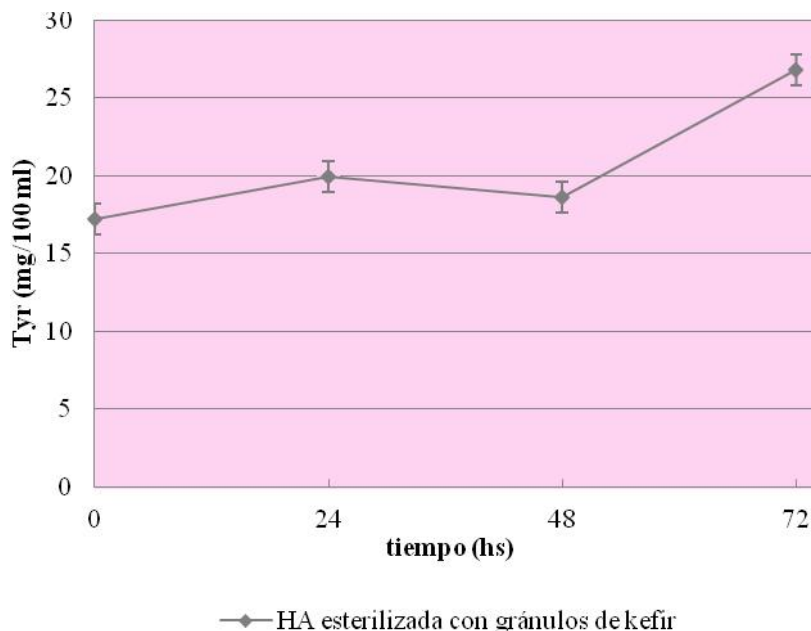


Figura 4.14 Contenido de nitrógeno soluble en TCA al 8 %p/v, expresado como mg Tyr/100 ml de suspensión, en función del tiempo de incubación

El aumento del contenido de nitrógeno TCA soluble a las 72 h refleja la tendencia del aumento de péptidos solubles que correlaciona con la disminución en la intensidad de bandas en los gels de tricina mostrados en la Figura 4.13.

4.4.3 Recuento de microorganismos viables

Sobre la suspensión de harina de amaranto esterilizada que se inoculó con gránulos de kefir se realizó el recuento de microorganismos totales, así como también de hongos y levaduras. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.15. Del análisis de la figura se desprende que el recuento de microorganismos, que provienen de los gránulos de kefir, se incrementó a lo largo del experimento. En agar YGC se observó la presencia exclusiva de levaduras, mientras que en las placas de agar nutritivo se observaron colonias correspondientes a bacterias y levaduras.

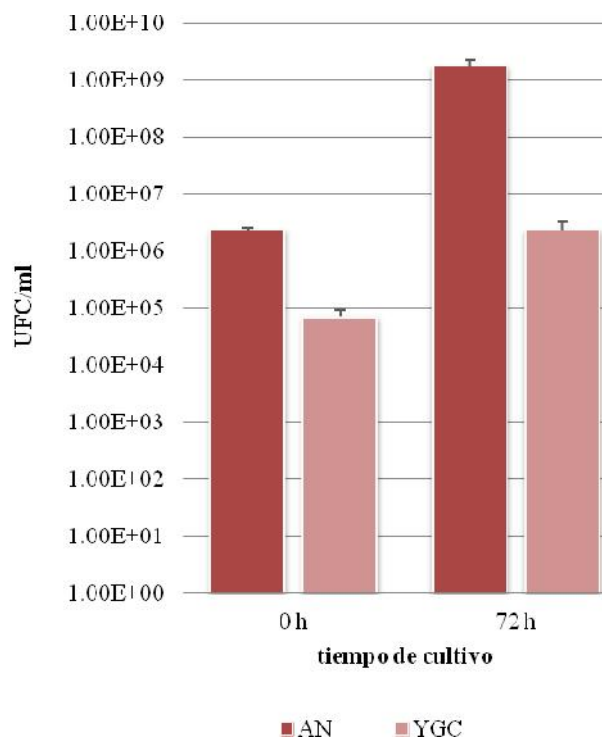


Figura 4.15 Recuento de microorganismos viables expresados como UFC/ml en agar nutritivo (AN) y en agar YGC, a tiempos 0 y 72 h de cultivo.

4.5 Selección de las condiciones de fermentación para la obtención de hidrolizados con actividad biológica

Sobre la base de los resultados presentados y teniendo en cuenta las características microbiológicas, se decidió seleccionar como condición para la obtención de péptidos el sistema correspondiente a la suspensión de harina de amaranto esterilizada que fue inoculada con gránulos de kefir. Esta elección se fundamenta por un lado en que los microorganismos presentes en los gránulos son ampliamente conocidos y entre ellos se encuentran microorganismos de uso habitual en alimentos fermentados muchos de los cuales son considerados probióticos mientras que los microorganismos provenientes de la harina de amaranto aún no se han estudiado en profundidad y hasta realizar un análisis más completo no se puede descartar la presencia de microorganismos alteradores y/o patógenos. Por otro lado, desde el punto de vista de la hidrólisis de proteínas, el sistema elegido fue uno de los que presentó mayores niveles de Nitrógeno TCA soluble lo cual aumenta las probabilidades de encontrar péptidos con propiedades bioactivas. Bertrand-Harb y col. (2002) encontraron que el tratamiento térmico de proteínas produce su desnaturalización y como consecuencia de esto se

exponen sitios susceptibles a la proteólisis realizada por diferentes proteasas, lo cual favorece la degradación de las proteínas en presencia de enzimas o microorganismos proteolíticos.

4.6 Caracterización de las suspensiones de harina de amaranto esterilizadas fermentadas con gránulos de kéfir.

4.6.1 Solubilidad de proteínas de las suspensiones. Método de Kjeldahl.

Se determinó el porcentaje de solubilidad de las proteínas en las suspensiones de harina de amaranto esterilizadas inoculadas con gránulos de kéfir. Las muestras se tomaron al inicio de la incubación (tiempo 0) y a las 24, 48 y 72 h como se ha mencionado en este trabajo. Para calcular la solubilidad se determinó nitrógeno total y nitrógeno soluble, en el sobrenadante de las suspensiones inoculadas centrifugadas adecuadamente, utilizando el método de Kjeldahl. Se calculó el porcentaje de solubilidad como la relación entre el nitrógeno soluble y el total para cada tiempo, multiplicando el resultado por 100. Los resultados se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Porcentaje de solubilidad de las proteínas de amaranto en las suspensiones de harina de amaranto esterilizada e inoculada con gránulos de kefir, determinado por el método de Kjeldahl.

Tiempo de incubación (h)	Proteína Total (mg/ml)	Proteína Soluble (mg/ml)	%Solubilidad
0	4,5	1,6	36,5
24	4,9	0,8	17,1
48	4,2	0,8	19,6
72	4,6	1,7	36,4

La solubilidad de las proteínas de la harina es relativamente baja. Esto se debe a que son pocas las proteínas solubles en agua. Se observa además que la solubilidad disminuye cuando aumenta el tiempo de incubación. Probablemente esta tendencia esté relacionada con la variación de pH que ocurre en las suspensiones y que se mostró en la Figura 4.10. Cabe mencionar que las proteínas de reserva del amaranto, 11S, 7S y Globulina P, presentan pI cercano a 4,5-5, característica que se aprovecha para aislarlas a partir de la harina. Sin embargo a las 72 h de incubación a pesar de que el pH se mantiene bajo, la solubilidad porcentual aumenta, hecho que se correspondería con el

aumento de los péptidos generados por la microbiota del kéfir, tal como se observa en la Figura 4.14.

4.6.2 Determinación de proteínas solubles por el método de Hull

Con la finalidad de disponer de un método colorimétrico para cuantificar proteínas solubles para normalizar el contenido de proteínas en los ensayos de actividad biológica, se adaptó el método de Hull que previamente se utilizó para cuantificar N-TCA soluble. Anteriormente se utilizó tirosina como standard para construir la curva de calibración. Como no se disponían de datos bibliográficos acerca del rango adecuado de concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) que usualmente se utiliza como patrón para realizar las curvas de calibración, se procedió a la búsqueda de la secuencia aminoacídica de esta proteína (Fig. 4.16) para determinar el contenido de aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptofano), que son los aminoácidos que reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

10	20	30	40	50	60
MKWVTFISLL	LLFSSAYSRG	VFRRDTHKSE	IAHRFKDLGE	EHFKGLVLIA	FSQYLQQCPF
70	80	90	100	110	120
DEHVKLVNEL	TEFAKTCVAD	ESHAGCEKSL	HTLFGDELCK	VASLRETYGD	MADCCCKQEP
130	140	150	160	170	180
ERNECFLSHK	DDSPDLPLK	PDPNTLCDEF	KADEKRFWVK	YLYEIARRHP	YFYAPELLYY
190	200	210	220	230	240
ANKYNGVVFQE	CCQAEDKGAC	LLPKIETMRE	KVLASSARQR	LRCASIQKFG	ERALKAWSVA
250	260	270	280	290	300
RLSQRFPKAE	FVEVTKLVTD	LTKVHKECCH	GDLLECADDR	ADLAKYICDN	QDTISSKLKE
310	320	330	340	350	360
CCDKPLLEKS	HCIAEVEKDA	IPENLPPLTA	DFAEDKDVCK	NYQEAKDAFL	GSFLYEYSRR
370	380	390	400	410	420
HPEYAVSVLL	RLAKEYEATL	EECCAADDPH	ACYSTVFDKL	KHLVDEPQNL	IKQNCQDFEK
430	440	450	460	470	480
LGEYGFQNAL	IVRYTRKVPQ	VSTPTLVEVS	RSLGKVGTRC	CTKPESERMP	CTEDYLSLIL
490	500	510	520	530	540
NRLCVLHEKT	PVSEKVTKCC	TESLVNRRPC	FSALTPDETY	VPKAFDEKLF	TFHADICTLP
550	560	570	580	590	600
DTEKQIKKQT	ALVELLKHKP	KATEEQKQTV	MENFVAFVDK	CCAADDKEAC	FAVEGPKLVV
STQTALA					

Fig. 4.16 Secuencia de aminoácidos correspondiente a la seroalbúmina bovina. Extraída de uniprot.org

Los aminoácidos ubicados en las posiciones 1 a 18 corresponden al péptido señal, en las posiciones 19 a 22 al propéptido y en las posiciones 25 a 607 a la BSA. A partir de la secuencia de aminoácidos se detectaron 20 residuos de tirosina entre las posiciones 25 a 607, 27 de fenilalanina y 2 de triptofano.

Conocido el contenido de aminoácidos aromáticos en la molécula de BSA se determinó analíticamente el intervalo de concentraciones equivalente al utilizado empleando L-tirosina como patrón. De esta forma se llegó a que el intervalo óptimo para utilizar BSA como patrón en el método de Hull es 0,15-1,5 mg/ml.

Una vez determinado el intervalo óptimo de concentraciones de BSA para utilizar como patrón en el método de Hull, se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadantes de harina desgrasada y en el liofilizado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.3. De acuerdo a los resultados mostrados se ve que existe una buena correlación entre ambos métodos.

Tabla 4.3 Contenido de proteína soluble en la suspensión de harina de amaranto desgrasada y en su liofilizado.

Suspensión de harina		Suspensión de harina liofilizada	
Proteína Soluble por Kjeldahl (mg/ml)	Proteína Soluble por Hull (mg/ml)	Proteína Soluble por Kjeldahl (mg/g)	Proteína Soluble por Hull (mg/g)
1,6	1,44	263	254

4.7 Análisis de las propiedades biológicas asociadas a los péptidos de amaranto

4.7.1 Determinación de la actividad antimicrobiana

4.7.1.1 Prueba de difusión en agar

Se analizó la potencial actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las suspensiones esterilizadas de harina de amaranto inoculadas con gránulos de kefir sobre el crecimiento de *E. coli*. Los sobrenadantes estudiados se neutralizaron y esterilizaron por calor húmedo en autoclave a 121°C y una atmósfera de sobrepresión. Sobre una placa de Petri con agar nutritivo se sembró un cultivo fresco de *E. coli*. Posteriormente sobre el agar sembrado se realizaron fosas de 5 mm de diámetro en las que se aplicaron

alícuotas de los sobrenadantes. Luego de incubar las placas a 37°C durante 24-48 h se procedió a la lectura de las mismas buscando obtener un halo de inhibición.

Las muestras analizadas no presentaron halos de inhibición sobre el crecimiento de *E. coli*. Algunas de las razones por las que no se observó la inhibición del crecimiento pueden deberse a que la concentración de proteínas no fuera suficiente o que el tratamiento térmico al que fueron sometidos los péptidos modificara su potencial actividad antimicrobiana por desnaturalización de los mismos.

4.7.1.2 Ensayo de inhibición en medio líquido. Determinación de la concentración inhibitoria mínima

La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las suspensiones esterilizadas de harina de amaranto y posteriormente inoculada con gránulos de kefir se determinó calculando el porcentaje de inhibición del crecimiento de *E. coli*. Las determinaciones se llevaron a cabo mediante el ensayo de dilución en microplaca. Se probaron los sobrenadantes liofilizados y resuspendidos en buffer PBS correspondientes al inicio del cultivo y a las 72 h de incubación. Además se evaluaron las mismas muestras previamente neutralizadas. El rango de concentraciones de proteína utilizado para estos ensayos fue 6,57 mg/ml a 12 µg/ml. En la Figura 4.17 se presenta el diseño de la placa y las diluciones realizadas.

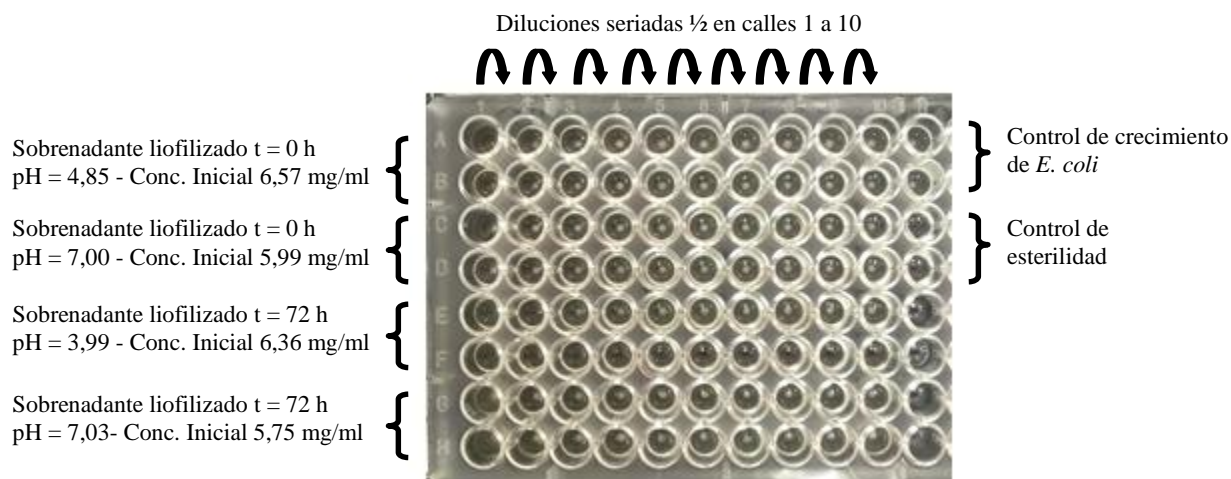


Figura 4.17 Ensayo de dilución en placa para *E. coli*.

Se midió la densidad óptica a 600 nm en cada pocillo de las microplacas. Con esos datos se calcularon los porcentajes de inhibición de crecimiento. La muestra preparada a partir de la suspensión de harina de amaranto esterilizada inoculada con los

gránulos a tiempo 0, inhibió parcialmente el crecimiento, en las 2 primeras diluciones, siendo la mínima concentración 3,29 mg/ml de proteína. El pH de este sobrenadante fue de 4,85.

La muestra preparada a partir de la suspensión de harina de amaranto esterilizada fermentada con los gránulos durante 72 h, cuyo pH fue 3,99, presentó inhibición parcial del crecimiento hasta la dilución que contenía 3,18 mg/ml de proteína.

Cuando ambos sobrenadantes fueron previamente neutralizados no se observó inhibición del crecimiento de *E. coli* a ninguna de las diluciones ensayadas.

Estos resultados indican que el efecto inhibitorio estaría dado fundamentalmente por los ácidos orgánicos presentes en las suspensiones, y no por la presencia de péptidos antimicrobianos.

Hasta el momento, solo hay reportes de actividad antimicrobiana de péptidos de amaranto contra hongos filamentosos como *Penicillium roqueforti* que se utiliza en la producción de quesos tipo azul (Rizzello y col., 2009), *Helminthosporium sativum* y *Fusarium culmorum* que son patógenos en plantas (Lipkin y col., 2005). Sin embargo con los resultados alcanzados no podemos descartar la idea de que se encuentren péptidos antibacterianos encriptados en las proteínas de amaranto, ya que sólo se enfrentaron a *E. coli* durante tiempos cortos de fermentación con gránulos de kefir. En el futuro se deberían analizar otras condiciones de incubación y otros microorganismos indicadores.

4.7.2 Determinación de la actividad antitrombótica in-vitro

Una de las posibles etapas implicadas en la formación anormal de trombos es la que involucra la acción de la serin-proteasa -trombina. Esta enzima interviene en la coagulación sanguínea catalizando la hidrólisis del fibrinógeno a fibrina y la posterior polimerización, además de ser un potente activador plaquetario. De esta forma ocurre el crecimiento de la masa trombótica compuesta de plaquetas, fibrina y eritrocitos, red que atrapa elementos sanguíneos en su interior para dar lugar a la formación del trombo en caso de una falla en la regulación del proceso de coagulación debida a la alteración de los mecanismos que la controlan.

Existen diversos tratamientos antitrombóticos que intentan impedir la formación o el crecimiento del trombo o facilitar su disolución endógena. Los agentes anticoagulantes y antiplaquetarios evitan la formación de los coágulos en sangre,

mientras que los agentes fibrinolíticos disuelven trombos ya existentes. Algunas sustancias, entre ellas algunos péptidos, se unen a alguno de los sitios activos de la trombina, o a ambos, inhibiendo su acción o también pueden ejercer acción inhibitoria al unirse a los sitios terminales de fibrinógeno impidiendo la transformación a fibrina.

Como ya fue descrito en Materiales y Métodos, sección 3.3.4, en el ensayo, una solución de trombina humana se coloca posteriormente a la incubación de las muestras con fibrinógeno bovino. Si las muestras ejercen efecto inhibitorio de la coagulación, impedirán total o parcialmente el desarrollo de turbidez asociado a la formación del coágulo de fibrina promovido por acción de la trombina. Este efecto podría deberse a que en las muestras se encuentren presentes péptidos que inhiban la acción proteolítica de la trombina. El efecto inhibitorio también podría deberse a péptidos que presenten secuencias tales que se unan a los monómeros de fibrina e impidan su polimerización.

Las medidas de esta actividad in vitro se realizaron con los sobrenadantes neutralizados liofilizados de las suspensiones de harina esterilizada inoculada con gránulos de kefir correspondientes al inicio y luego de 72 h de incubación. El sobrenadante correspondiente al inicio del cultivo, no presentó actividad inhibitoria de la coagulación aproximadamente en el intervalo de concentraciones analizadas.

Por otro lado, el sobrenadante correspondiente a las 72 h de incubación (Figura 4.18) presentó actividad inhibitoria de la coagulación a partir de los 0,44 mg/ml de proteína.

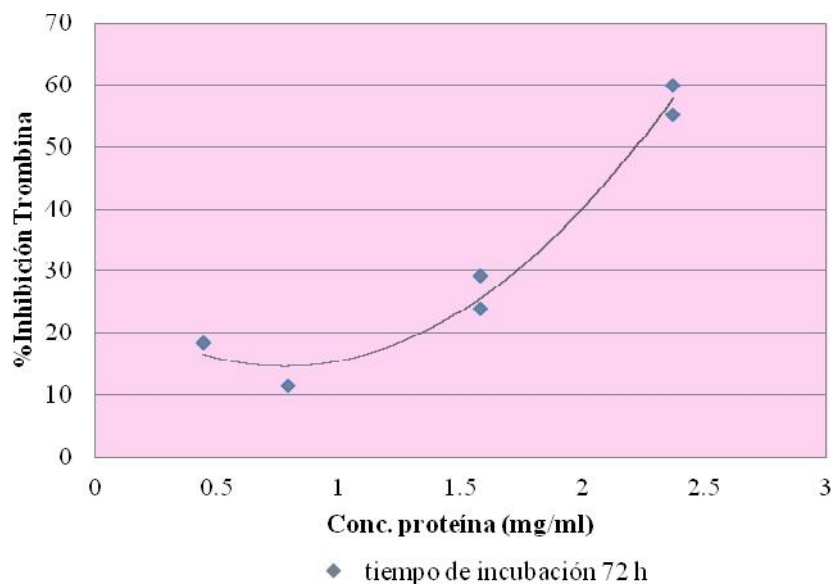


Figura 4.18 Inhibición de la coagulación producida por diferentes concentraciones de proteína en la suspensión de harina de amaranto esterilizada e inoculada con gránulos de kefir luego de 72 h de incubación

Cuando se analiza el comportamiento de esta muestra, se observa que la inhibición alcanzada depende de la concentración, presentando una curva del tipo dosis-respuesta ajustando los datos a un polinomio de orden 2. A partir de esa curva se calculó la concentración que provoca el 50% de la inhibición de la coagulación, IC_{50} , la que resultó igual a 2,22 mg/ml.

Este resultado comprueba la efectividad del tratamiento de la fermentación por acción de los microorganismos contenidos en los gránulos de kefir, sobre los componentes de la harina de amaranto. Una posibilidad es que se hayan liberado péptidos con actividad antitrombótica que se encontraban encriptados dentro de las proteínas de amaranto. Resultados previos encontrados en el laboratorio donde fue desarrollado este trabajo utilizando aislados proteicos de amaranto hidrolizados con alcalasa y tripsina, muestran valores de $IC_{50} = 5$ mg/ml (Sabbione y Scilingo, 2010). Además cuando se determinó la actividad antitrombótica de hidrolizados de *Amaranthus hypochondriacus* obtenidos por activación de una proteasa aspártica del aislado a pH ácido (pH = 2), se obtuvo una $IC_{50} = 5,9$ mg/ml (Ibañez, 2012). Si bien los resultados obtenidos en este trabajo muestran un valor de IC_{50} inferior a los informados anteriormente cabe mencionar que estos son resultados fueron obtenidos a partir de harinas y no de aislados proteicos. Es necesario considerar que la muestra no está compuesta por un solo péptido o polipéptido, sino que contiene diversos componentes, algunos de los cuales podrían no presentar actividad antitrombótica. No obstante no podemos descartar que la fermentación haya producido en la muestra otros cambios en la muestra no cuantificados en este trabajo.

Utilizando la misma metodología que en este trabajo Zhang y col. (2008) encontraron potencial actividad antitrombótica de péptidos de semillas de colza fraccionados utilizando columnas de adsorción con una $IC_{50} = 30$ mg/ml. Por otro lado, Yang y col. (2006) informaron actividad antitrombótica de proteínas e hidrolizados de clara de huevo utilizando concentraciones mayores de proteína.

Otros ensayos de actividad antitrombótica in vitro e in vivo realizados por Rutherford y Gill (2000) utilizando proteínas y péptidos obtenidos a partir de β -caseína y del glicomacropéptido, mostraron que para lograr el 50% de la inhibición de la agregación plaquetaria y de la formación del trombo se necesitaron concentraciones entre 0,5 y 2 mg/ml.

Estos resultados preliminares indican que la fermentación de la harina de amaranto con gránulos de kéfir permite obtener un producto con potencial actividad

antitrombótica. Para futuras experiencias se debería indagar la o las fracciones responsables de la actividad biológica.

Capítulo 5

Conclusiones Generales

5 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se abordó por primera vez el estudio de la fermentación de amaranto por gránulos de kefir. Se analizó la capacidad de los gránulos de kefir de fermentar y/o modificar los componentes de las suspensiones de harina de amaranto desgrasada con la finalidad de adquirir conocimientos que sirvan de base para desarrollar ingredientes biológicamente activos. Los principales resultados obtenidos fueron los siguientes:

- La harina de amaranto obtenida en el laboratorio se caracterizó desde el punto de vista químico, y mediante el análisis del comportamiento de la suspensión de harina de amaranto cuando se mantenía a 20°C durante 72 horas surge que la suspensión de harina de amaranto contenía microorganismos capaces de acidificar el medio y degradar parcialmente las proteínas presentes.
- Los gránulos de kefir fueron capaces de fermentar la suspensión de harina sometida o no a tratamiento esterilizante.
- Los microorganismos de los gránulos de kefir fueron capaces de fermentar la harina de amaranto y degradar sus proteínas generando péptidos.
- El tratamiento térmico de las proteínas de amaranto aumentó la susceptibilidad de ser sustrato para los microorganismos de los gránulos de kefir.

En cuanto a las actividades biológicas analizadas en este trabajo, se concluye que:

- No se pudo verificar que la hidrólisis realizada por los microorganismos contenidos en los gránulos de kefir produjera péptidos antimicrobianos.
- Los péptidos producidos durante la fermentación de la harina con gránulos de kefir inhibieron la formación del trombo de fibrina.
- Se pudo determinar la concentración que inhibe el 50% de la coagulación en las condiciones de ensayo (IC₅₀) siendo de 2,2 mg/ml para el producto fermentado durante 72 h.

Por último, se puede concluir que la hidrólisis de proteínas de amaranto producida por microorganismos es una alternativa para la obtención de péptidos con actividad biológica y debe continuar siendo estudiada. Con respecto a la actividad antimicrobiana

de los productos obtenidos no puede descartarse la presencia de péptidos activos ya que sólo se utilizó *E. coli* como microorganismo indicador y además no se ensayaron otras condiciones de hidrólisis.

Capítulo 6

Referencias Bibliográficas

6 REFERENCIAS

- Abraham A. G.; de Antoni G. L. *Characterization of kefir grains grown in cows' milk and in soy milk*. Journal of Dairy Research 66 (1999) 327-333.
- Abraham, A. G.; De Antoni, G. L.; Añón, M. C. *Proteolytic activity of Lactobacillus bulgaricus grown in milk*. Journal of Dairy Science 76 (1993) 1498-1505.
- Abugoch L. E. *Relación estructura-funcionalidad de glutelinas y aislados proteicos de amaranto (Amaranthus hypocondriacus)*. Tesis doctoral (2006), UNLP.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists Inc. *Official Methods of Analysis* 14th Edition (1984) Ed. Williams S.; Arlington V. A. Método 2057, 16.
- Barba de la Rosa A. P.; Gueguen J.; Paredes-López O.; Viroben G. *Fractionation procedures, electrophoretic characterization and aminoacid composition of amaranth seed proteins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40 (1992) 931-936.
- Berganza B. F.; Morán A. W.; Rodríguez G.; Coto N. M.; Santa María M.; Bressani R. *Effect of variety and location on the total fat, fatty acids and squalene content on amaranth*. Plant Food for Human Nutrition 58 (2003) 1-6.
- Bertrand-Harb, C., Baday, A., Dalgalarondo, M., Chobert, J. M.; Haertlé, T. *Thermal modifications of structure and codenaturation of -lactalbumin and -lactoglobulin induce changes of solubility and susceptibility to proteases*. Nahrung, 46 (2002) 283-289.
- Cai Y.; Sun M.; Wu H.; Huang R.; Corke H. *Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse Amaranthus species*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46 (1998) 2063-2070.
- Castellani O. F. *Caracterización estructural y fisicoquímica de la globulina-P de amaranto*. Tesis doctoral (2000), UNLP.
- Castellani, O. F.; Martinez, E. N.; Añón, M. C. *Amaranth globulin structure modifications induced by enzymatic proteolysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48 (2000) 5624-5629.
- Castellani, O.F., Martínez, E.N., Añón, M.C. *Structural modifications of an amaranth globulin induced by pH and NaCl*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46 (1998) 4846-4853.

-
- Chen H. M.; Muramoto K.; Yamahuchi F.; Fujimoto K.; Nokihara K. *Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46 (1998) 49-53.
- Chen, S., Paredes-López, O. *Isolation and Characterization of the 11S Globulin From Amaranth Seeds*. Journal of Food Biochemistry 21 (1997) 53-65.
- Código Alimentario Argentino.
http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp
- Cui X. H.; Chen S. J.; Wang Y.; Han J. R. *Fermentation conditions of walnut milk beverage inoculated with kefir grains*. LWT – Food Science and Technology 50 (2013) 349-352.
- Fang Y. Z.; Yang S.; Wu G. *Free radicals, antioxidants and nutrition*. Nutrition 10 (2002) 872-879.
- Farnworth, E. R. *Kefir – a complex probiotic*. Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods 2 (2005) 1-17.
- Fisher R. A. *Statistical Methods for Research Workers*. Oliver and Boyd (1954).
- FitzGerald R. J.; Murray B. A.; Walsh D. J. *Hypotensive peptides from milk proteins*. Journal on Nutrition 134 (2004) 980-988.
- Fritz M.; Vecchi B.; Rinaldi G.; Añón M. C. *Amaranth seed protein hydrolysate have in vivo and in vitro antihypertensive activity*. Food Chemistry 126 (2011) 878-884.
- Garrote G. L.; Abraham, A. G.; De Antoni, G. L. *Chemical and microbiological characterization of kefir grains*. Journal of Dairy Research 68 (2001) 639-652.
- Garrote G.; Abraham A. G.; de Antoni G. *Characteristics of kefir prepared with different grain: milk ratios*. Journal of Dairy Research 65 (1998) 149-154.
- Garrote G.; Abraham A. G.; de Antoni G. *Preservation of kefir grains, a comparative study*. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie 30 (1997) 77-84.
- Gorinstein S.; Zemser M.; Fliess A.; Shnitman I.; Paredes-López O.; Yamamoto K.; Kobayashi S.; Taniguchi H. *Computational analysis of the amino acid residue sequences of amaranth and some other proteins*. Bioscience, biotechnology, and Biochemistry 62 (1998) 1845-1851.

- Gorinstein S.; Delgado-Licon E., Pawelzik E.; Permady H. H.; Weisz M.; Trakhtenberg S. *Characterization of soluble amaranth and soybean proteins based on fluorescence, hydrophobicity, electrophoresis, amino acid analysis, circular dichroism, and differential scanning calorimetry measurements*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49 (2001) 5595- 5601.
- Gudiña E. J.; Rocha V.; Teixeira J. A.; Rodrigues L. R. *Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from Lactobacillus paracasei ssp. paracasei A20*. Letters in Applied Microbiology 50 (2010) 419-424.
- Hancock R. E. W. *Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials*. Lancet Infectious Diseases 1 (2001) 156-164.
- Hartmann R.; Meisel H. *Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications*. Current Opinion in Biotechnology 18 (2007) 163-169.
- Hull, M. E. *Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins*. Journal of Dairy Science 30 (1947) 881.
- Ibañez, S. M. *Determinación de la actividad biológica de hidrolizados proteicos de amaranto preparados por acción de una proteasa endógena*. Tesis de grado (2012), UNLP.
- Kitts D. D.; Weiler K. *Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery*. Current Pharmaceutical Design 9 (2003) 1309-1323.
- Konishi Y.; Horikawa K.; Oku Y.; Azumaya J.; Nakatani N. *Extraction of two albumin fractions from amaranth grains: comparison of some physicochemical properties and the putative localization in the grains*. Agricultural and Biological Chemistry 55 (1991) 1745-1750.
- Korhonen H.; Pihlanto A. *Bioactive peptides: Production and Functionality*. International Dairy Journal 16 (2006) 945-960.
- Laudano A. P.; Doolittle R. F. *Synthetic peptides derivatives that bind to fibrinogen and prevent the polymerization of fibrin monomers*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75 (1978) 3085-3089.
- Lipkin A.; Anisimova V.; Nikonorova A.; Babakov A.; Krause E.; Beinert M.; Grishin E.; Egorov T. *An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (Amaranthus retroflexus L.) seeds*. Phytochemistry 66 (2005) 2426-2431.

-
- Liu J. R.; Chen M. J.; Lin C. W. *Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53 (2005) 2467-2474.
- Macler B. A.; MacElroy R. D. *Productivity and food value of Amaranthus cruentus under non-lethal salt stress*. Advances in Space Research 9 (1989) 135-139.
- Marcone M. F. *First report of the characterization of the threatened plant species Amaranthus pumilus (Seabeach Amaranth)*. Journal of Agricultural Food Chemistry 48 (2000) 378-382.
- Marcone M. F.; Kakuda Y. *A comparative study of functional properties of Amaranth and soybean globulins isolates*. Nahrung 43 (1999) 368-373.
- Marcone, M.F., Kakuda, Y., Yada R.Y. *Immunochemical examination of the surface physico-chemical properties of various dicotyledonous globulin seed storage proteins*. Food Chemistry 63 (1998) 85-95.
- Martínez N. E.; Añón M. C. *Composition and structural characterization of amaranth proteins isolates. An electrophoretic and calorimetric study*. Journal of Agricultural and Chemistry 44 (1996) 2523-2530.
- Martínez, E. N.; Castellani, O. F.; Añón, M. C. *Common molecular features among amaranth storage proteins*. Journal of Agricultural Food Chemistry 45 (1997) 3832-3839.
- Mateo J.; Santamaría A.; Fontcuberta J. *Fisiología y exploración de la hemostasia*. Hematología Clínica 5ta. Edición, Elsevier España (2006).
- Orsini Delgado M. C.; Tironi V. A.; Añón M. C. *Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion*. LWT 44 (2011) 1752-1760.
- Osborne T. *The vegetable proteins*. Journal of the Society of Chemical Industry 43 (1924) 440-452.
- Osuna-Castro, J.A., Rascón-Cruz, Q., Napier, J., Fido, R., Shewry, P., Paredes-López, O. *Overexpression, purification, and in vitro refolding of the 11S globulin from amaranth seed in E. coli*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48 (2000) 5249-5255.
- Paredes-López O. *Amaranth: Biology, Chemistry and Techonology*. CRC Press (1994).

-
- Peña-Ramos E. A.; Xiong Y. L.; Arteaga G. E. *Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein*. Journal of the Science of Food and Agriculture 84 (2004) 1908-1918.
- Puerari C.; Teixeira Magalhães K.; Freitas Schawn R. *New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analyses*. Food Research International 48 (2012) 634-640.
- Qin L.; Guo S.; Ai W.; Tang Y.; Cheng Q.; Chen G. *Effect of salt on growth and physiology in amaranth and lettuce: implications for bioregenerative life support system*. Advances in Research Space 51 (2013) 476-482.
- Qin L.; Guo S.; Ai W.; Tang Y. *Selection of candidate salad vegetables for controlled ecological life support system*. Advances in Research Space 41 (2008) 768-772.
- Rizzello C. G.; Coda R.; De Angelis M.; Di Cagno R.; Carnevali P.; Gobbetti M. *Long-term fungal inhibitory activity of wáter-soluble extract from Amaranthus spp. seeds during storage of gluten-free and wheat flour breads*. International Journal of Food Microbiology 131 (2009) 189-196.
- Rodas B.; Bressani R. *Contenido de aceite, ácidos grasos y escualeno en variedades crudas y procesadas de grano de amaranto*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 59 (2009) 82-87.
- Rutherford K.J., Gill, H.S. *Peptides affecting coagulation*. British. Journal of Nutrition., 84 (2000) 99-102.
- Sabbione A. C.; Scilingo A. *Actividad antitumoral y antitrombótica de proteínas de amaranto modificadas por hidrólisis enzimática*. XVIII Jornadas de Jóvenes Investigadores. Santa Fe, Argentina. Octubre 19 al 21 de 2010.
- Salnikow, J., Zemser, M., Gorinstein, S., Friedman, M., Scheler, Ch., Paredes-López, O. *Structure-function relationships of folded and unfolded Amaranth proteins*. Journal of Protein Chemistry 17 (1998) 543-545.
- Saloff-Coste C. *Kefir*. Danone World Nutritopics N° 11 (2005).
- Schägger, H. *Tricine-SDS-PAGE*. Nature Protocols 1 (2006) 16-22.
- Segura-Nieto M.; Barba de la Rosa A. P.; Paredes-López O. *Biochemistry of amaranth proteins. Amaranth, chemistry and technology*. Boca Ratón: CRC (1994) 75-106.
- Segura-Nieto M.; Vázquez-Sánchez N.; Rubio-Velázquez H.; Olgúin-Martínez L. E.; Rodríguez-Néster C. E.; Herrera-Estrella L. *Characterization of amaranth*

-
- (*Amaranthus hypocondriacus L.*) seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40 (1992) 1553-1558.
- Séverin S.; Wenshui X. *Milk biologically active components as nutraceuticals: Review*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45 (2005) 645-656.
- Stark M.; Liu L. P., Deber C. M. *Cationic hydrophobic peptides with antimicrobial activity*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (2002) 3585-3590.
- Suetsuna K.; Ukeda H.; Ochi H. *Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein*. *Journal of Nutrition and Biochemistry* 11 (2000) 128-131.
- Szewczuk Z.; Gibbs B. F.; Yue S. Y.; Purisima E. O.; Konishi Y. *Conformationally restricted thrombin inhibitors resistant to proteolytic digestion*. *Biochemistry* 31 (1992) 9132-9140.
- Tironi V. A.; Añón M. C. *Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: effect of proteolysis*. *Food Research International* 43 (2010) 315-322.
- Tovar-Pérez E. G.; Guerrero-Legarreta I.; Farrés-González A.; Soriano-Santos J. *Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin I and globulin as obtained of amaranth grain*. *Food Chemistry* 116 (2009) 437-444.
- Vecchi B.; Añón M. C. *ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypocondriacus* 11S globulin*. *Phytochemistry* 70 (2009) 864-870.
- Wallace J. S.; Powers J. V. *Publications of the NASA Controlled Ecological Life Support System (CELSS) Program 1979-1989*. NASA Contractor Report 4297 (1990).
- Yang W. G.; Wang Z.; Xu S. Y. *A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader*. *Chinese Chemical Letters* 18 (2006) 449-451.
- Zhang S. B.; Wang Z.; Xu S. Y. *Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85 (2008) 521-527.
- Zourari A.; Anifantakis E. M. *Le Kéfir: Caractères physicochimiques, microbiologiques et nutritionnels. Technologie de production. Une revue*. *Le Lait* 68 (1988) 373-392.