



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



50 años
UNIVERSIDAD
D SALAMANCA

1218 - 2018

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y
GENÉTICA**

TESIS DOCTORAL

**ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS
GLUTENASA Y FITASA EN LEVADURAS
FERMENTATIVAS**

**PAULA XIOMARA MÉNDEZ MÉNDEZ
2020**



A mis hijos, Rafael José y Rancel

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento a la **Dra. M^ª Ángeles Santos García**, por haberme guiado en estos años de formación, por su paciencia, empeño, dedicación y generosidad, dándome la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis doctoral que ha supuesto para mí, ríos de experiencias extraordinarias e invaluable.

A la **Universidad Autónoma de Santo Domingo**, por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo de tesis doctoral.

Al **Ministerio de Educación Superior Ciencia y Tecnología, MESCyT**, por otorgarme la beca que hizo posible la realización de esta investigación de tesis doctoral.

A la **Dra. Soledad Vega**, mi compañera de laboratorio por estos cuatro años, gracias por siempre estar.

Del Departamento de Microbiología y Genética de la Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, agradezco a la Dra. Nieves Vizcaíno Santiso, Dra. Alicia Rodríguez Barbero, Dr. Fernando Sánchez Juanes, Dr. Alberto Jiménez García, Dr. Rubén Martínez Buey, Dr. José Antonio Uña, todos ellos en sus diferentes campos han puesto su granito de arena para que esta tesis doctoral sea una realidad.

A todo el personal del Edificio Departamental de Biología que he conocido a lo largo de estos años que de una manera u otra han contribuido a mi formación.

A mis amigos en España y en República Dominicana por estar ahí para mis desahogos en las frustraciones que genera la realización de la tesis doctoral.

Agradezco de forma especial a mi familia, por su comprensión al tolerar mi ausencia en estos años, por animarme cada día a seguir, por creer en mí, por estar para mí.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
	I.1. PROCESOS FERMENTATIVOS	3
	I.2. LA FERMENTACIÓN EN LA INDUSTRIA DE LA PANIFICACIÓN	4
	I.3. EL GLUTEN	7
	I.3.1 PROTEÍNAS DEL GLUTEN	7
	I.3.2 PROTEÍNAS DEL GLUTEN POTENCIALMENTE TÓXICAS	9
	I.3.3 DETOXIFICACIÓN DEL GLUTEN	10
	I.4. EL ÁCIDO FÍTICO	12
	I.4.1 LAS FITASAS	14
2.	OBJETIVOS	18

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

Figura I.1. Elaboración de alimentos fermentados.....	1
Figura I.2. Estructura del grano de cereal.....	3
Figura I.3. Propiedades potenciales de las levaduras <i>no Saccharomyces</i> en fermentación.....	5
Figura I.4. Estrategias para mantener una dieta libre de gluten.....	10
Figura I.5. Reacción catalizada por la enzima fitasa.....	12
Figura I.6. Clasificación de las enzimas fitasa.....	13

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura MM.1. Vector de expresión bacteriano pETEV15b.....	31
Figura MM.2. Mapa del vector de expresión pPIC9 y secuencias relevantes para la clonación...	32

CAPÍTULO 1

Figura C1.1. Fracciones proteicas de la harina de trigo.....	44
Figura C1.2. Identificación de las proteínas del gluten en la harina de trigo.....	45
Figura C1.3. Identificación de las proteínas del gluten en la harina de tritordeum.....	46
Figura C1.4. Identificación de levaduras con actividad proteasa extracelular.....	47
Figura C1.5. Proteínas del gluten empleadas en la elaboración de medios de cultivo.....	48
Figura C1.6. Identificación de levaduras con capacidad de hidrolizar proteínas de gluten en cultivos líquidos.....	49
Figura C1.7. Comparación de la actividad glutenasa de <i>P. fermentans</i> y <i>W. anomalus</i>	50
Figura C1.8. Actividad glutenasa en medio sólido.....	50
Figura C1.9. Capacidad de <i>W. anomalus</i> de producir actividad glutenasa para su Proliferación en medios con proteínas del gluten.....	51
Figura C1.10. Estabilidad de la actividad glutenasa en cultivos continuos.....	52
Figura C1.11. Fermentación de harinas panificables.....	53
Figura C1.12. Análisis de la actividad gliadinasa en la fermentación de harinas.....	55
Figura C1.13. Efecto de la cantidad de levadura en la hidrólisis de gliadinas.....	56
Figura C1.14. Efecto del tiempo de fermentación en la hidrólisis de gluteninas.....	57
Figura C1.15. Fermentaciones de harina de trigo y obtención de pan.....	58

Figura C1.16. Incidencia de la actividad fermentativa de <i>W. anomalous</i> en el contenido del péptido inmunogénico 33-mer en pan.....	59
Figura C1.17. Aislamiento de una bacteria capaz de degradar gluten.....	60
Figura C1.18. Crecimiento de la bacteria BG222 en medios líquidos.....	61
Figura C1.19. Actividad glutenasa de la bacteria BG222.....	61
Figura C1.20. Efecto de la bacteria BG222 en la hidrólisis de gliadinas durante fermentación..	63
Figura C1.21. Amplificación y clonación del gen RNA 16S de la bacteria BG222.....	64

CAPÍTULO 2.

Figura C2.1. Identificación de cepas de levaduras con actividad fitasa mediante una prueba de crecimiento.....	74
Figura C2.2. Actividad fitasa de <i>W. anomalous</i> en una amplia variedad de cepas.....	75
Figura C2.3. Alineamiento de secuencias e identificación de motivos fitasa.....	76
Figura C2.4. Amplificación de dos de los genes codificantes de las potenciales fitasas de <i>W. anomalous</i> ME1FP-9.....	78
Figura C2.5. Construcción de los vectores de expresión.....	79
Figura C2.6. Expresión de las potenciales fitasas de <i>W. anomalous</i> en <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	80
Figura C2.7. Solubilidad de las proteínas de expresión Wa17527 y Wa32492.....	81
Figura C2.8. Solubilización de las proteínas de expresión.....	81
Figura C2.9. Amplificación, clonación y expresión de las nuevas versiones génicas.....	83
Figura C2.10. Solubilidad de la proteína de expresión Wa17527Nol.....	84
Figura C2.11. Construcción de los plásmidos para la expresión de los genes <i>Wa17527ss</i> y <i>Wa32492ss</i> en la levadura <i>P. pastoris</i>	85
Figura C2.12. Integración de los módulos de expresión en el genoma de <i>P. pastoris</i>	87
Figura C2.13. Análisis de la fracción proteica intracelular de clones recombinante de <i>P. pastoris</i>	88
Figura C2.14. Expresión extracelular de la proteína W32492 en <i>P. pastoris</i>	89
Figura C2.15. Actividad fitasa de la proteína recombinante Wa32492ss.....	91
Figura C2.16. Actividad fitasa extracelular de las cepas de <i>P. pastoris</i> que portan el	

módulo de expresión <i>Wa32492ss</i>	92
--	----

TABLAS

Tabla 1. Proteínas del gluten de trigo.....	7
Tabla 2. Contenido de ácido fítico en grano de cereales.....	11
Tabla 3. Cepas de levaduras.....	21
Tabla 4. Relación de oligonucleótidos.....	29

1. INTRODUCCIÓN

I.1. PROCESOS FERMENTATIVOS

La fermentación es un proceso biotecnológico natural utilizado por la humanidad desde la antigüedad para la elaboración de alimentos y bebidas (Hutkins, 2008). Durante miles de años los procesos de fermentación eran espontáneos, y no fue hasta la década de 1850-60, que el químico y microbiólogo francés Louis Pasteur demostró que el proceso lo realizaban células vivas (Barnett, 2000), cuando se comenzó a realizar las fermentaciones de forma controlada, mediante la adición del microorganismos u microorganismos fermentantes. Al organismo o mezcla de ellos se le denomina inóculo o estárter.

La producción de alimentos tales como el pan, el yogurt, vino, cerveza o embutidos requieren de procesos fermentativos. La elaboración de esos alimentos y bebidas fermentadas se hace mediante el crecimiento controlado de microorganismos en la materia prima y la adición de enzimas u otros compuestos.

La acción conjunta de los microorganismos y los aditivos añadidos conduce a obtener un producto con mejores cualidades, bien por mejorar su propiedades organolépticas (apariencia, aroma, textura, sabor), extender el periodo de vida, reducir o eliminar alérgenos u otros productos indeseados mal absorbidos en el intestino delgado (fitato o carbohidratos de cadena corta y alcoholes relacionados, FODMAPS) o generar productos bioactivos que tienen una incidencia positiva en la salud humana (vitaminas, fenoles, péptidos, entre otros) (Fig. I.1) (Marco *et al.*, 2017).

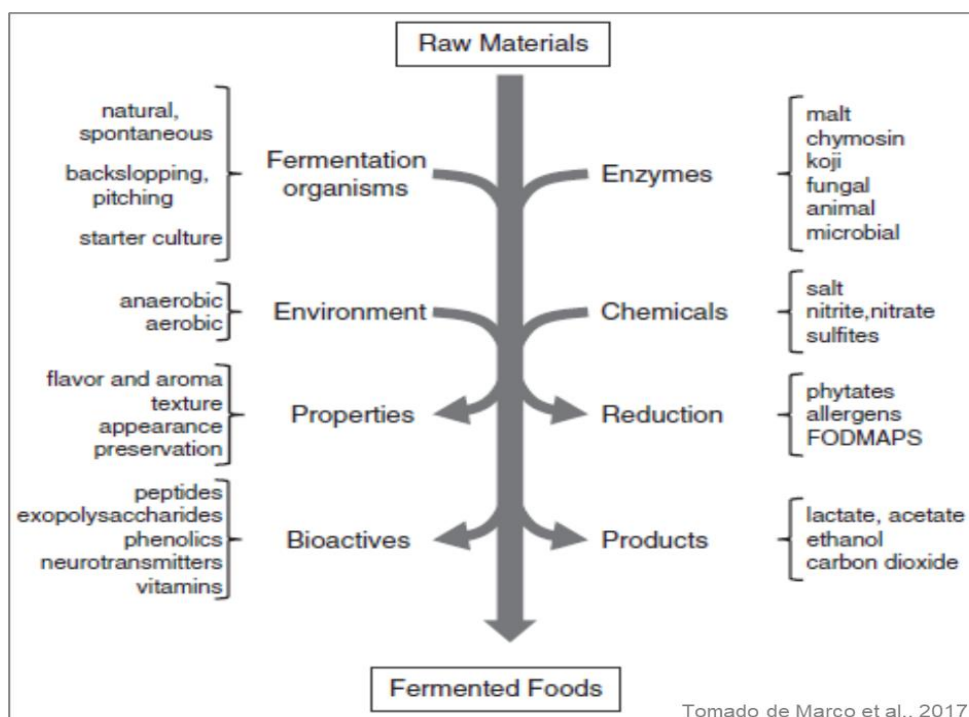


Figura I.1. Elaboración de alimentos fermentados. Acción de los microorganismos y otros aditivos en la modificación del material de partida y formación de nuevos compuestos.

Si se atiende a los metabolitos primarios y los microorganismos que los producen, en los procesos de fermentación de alimentos se pueden distinguir **varios tipos de fermentaciones**: **alcohólica**, se produce alcohol y CO₂ y la realizan principalmente **levaduras**; **acética**, se forma ácido acético y son generalmente **bacterias** del género **Acetobacter**; **láctica**, se produce ácido láctico y la llevan a cabo las bacterias del ácido láctico (BAL), tales como especies de los géneros *Lactobacillus* o *Leuconostoc*; **propiónica**, se produce ácido propiónico y la realizan bacterias del género *Propionibacterium*; y fermentación **del amonio y ácidos grasos**, realizada por bacterias (*Bacillus*) y **hongos filamentosos** (Marco *et al.*, 2017).

En cuanto a los sustratos o matrices que se usan para la elaboración de alimentos fermentados son muchos, pero algunos a destacar en la dieta mediterránea son: la carne, para la elaboración de embutidos; el pescado, para la elaboración de salsas y pastas de pescado; lácteos, para la elaboración de yogures, kéfir o quesos; uvas y otras frutas, para la elaboración de bebidas alcohólicas; cereales, para la elaboración de cerveza, pan y otros productos de panadería; y legumbres, para la elaboración de pan y otros productos de panadería sin gluten.

1.2. LA FERMENTACIÓN EN LA INDUSTRIA DE LA PANIFICACIÓN

Los alimentos derivados de la fermentación de harinas, obtenidas de la molienda de granos de cereal, generalmente trigo, son importantes en la dieta diaria, en general en todo el mundo, pero en particular en Europa. Estudios de hace algunos años revelaban que la ingesta de pan en países europeos estaba entre 46 (Suecia, Gran Bretaña, Finlandia y Austria) y 100 kg (Grecia, Portugal, España e Italia) por persona y año (Gobetti *et al.*, 2014).

Los **productos de panificación** representan a una gran variedad de alimentos que tienen en común el que derivan de la fermentación del mismo tipo de **matriz, harina de cereales**. Otra característica común es que para su elaboración se usan **tres ingredientes básicos, harina** de trigo, principalmente sola, aunque se puede combinar con harinas de otros cereales, **agua** y **agentes gasificantes**. Además, todos comparten el mismo **proceso básico de elaboración, mezclado** de ingredientes, **fermentación** de la masa obtenida anteriormente y **horneado o cocción** del producto fermentado (Pagani *et al.*, 2013).

La harina es un ingrediente de especial importancia para obtener productos que satisfagan los gustos del consumidor. Los mejores resultados en términos de volumen y apariencia se obtienen con la harina de trigo (*Triticum aestivum*, *T. durum*), aunque con las harinas de cebada y centeno también se pueden obtener buenos productos. La superioridad tecnológica del trigo se debe a las particularidades de su contenido proteico. Las proteínas almacenadas en el grano de trigo son gliadinas y gluteninas, clasificadas según el peso molecular (Pm), solubilidad y conformación. Representan 80% de la fracción proteica total del grano, tienen una composición particular de aminoácidos, alto porcentaje de glutamina y prolina y bajo contenido de lisina. Cuando se hidrata la harina, la interacción de esas proteínas, uniones no covalentes (interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno) y covalentes (puentes disulfuro entre residuos de cisteína), conduce a la formación del gluten, estructura tridimensional homogénea que se forma en la masa. Los dos tipos de harina que se usan en panificación son la harina refinada y la harina integral. La primera deriva de la molienda del grano al que se le ha eliminado las capas más externas y el endospermo y la segunda se obtiene a partir del grano entero (Fig. 1.2). La harina integral tiene menor valor nutritivo y es menos saludable que la harina refinada, debido a la pérdida del 70% de sales minerales, entre el 15-40% de vitaminas, el 55% de grasa y el 95% de fibra (Farber, 2010).

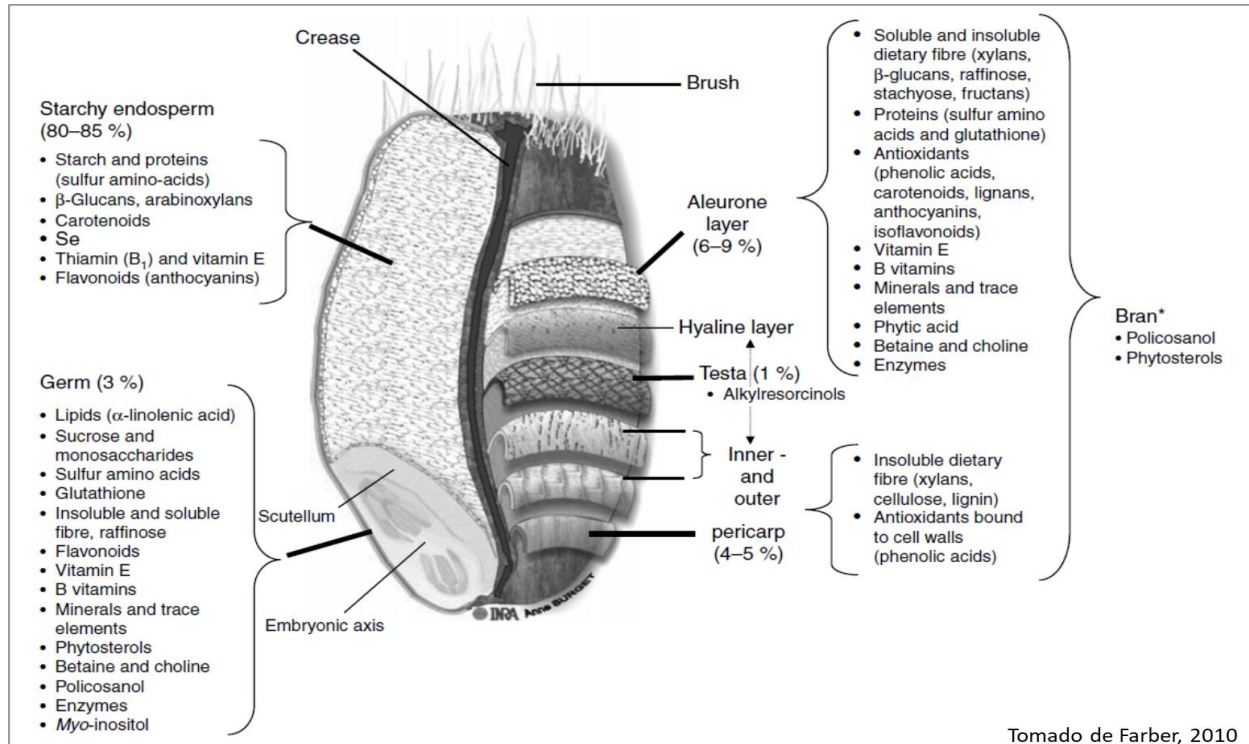


Figura I.2. Estructura del grano de cereal. Se muestran las tres fracciones principales que se obtienen en la molienda (el salvado, el germen y el endospermo) con los principales compuestos bioactivos contenidos en cada fracción.

La fermentación generalmente se realiza **con levadura** pura. Desde finales del siglo XIX, que Emil Christian Hansen aisló la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y que ésta se pudiese producir a gran escala (Botstein & Fink, 2011), el proceso de fermentación para la elaboración de productos de panadería a nivel industrial se realiza con *Saccharomyces cerevisiae*, también conocida como la levadura de panadería o de los panaderos.

Hoy en día, hay una gran variedad de cepas de levadura de panadería disponibles en el mercado, con una vida útil diferente (levadura en crema, prensada y seca o liofilizada), con características diversas de osmotolerancia (aptas para la fermentación de masas con alto contenido en azúcares) o activas a temperaturas variables (fermentación de masas congeladas) (Pagani *et al.*, 2013).

En la fermentación, después de una breve respiración inicial, debida a la actividad del oxígeno dispersado en la masa, la levadura de panadería fermenta glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa de la harina a CO₂ y etanol. Además de los dos metabolitos primarios, la levadura produce otros metabolitos como ácidos orgánicos, glicerol y compuestos aromáticos que tienen un impacto importante, tanto en el proceso tecnológico de elaboración como en la calidad y características organolépticas del producto final (Struyf *et al.*, 2017).

Otro agente fermentativo, usado para la elaboración de productos artesanales propios y distintivos de diferentes zonas geográficas, es la **masa madre**. Es una mezcla de harina y H₂O fermentada exclusivamente por microorganismos que están en la harina y/o en el ambiente, levaduras y bacterias del ácido láctico (BAL). La microbiota de la masa madre se mantiene “viva” por refrescos periódicos que

básicamente consisten en añadir una porción de la masa madre a una nueva masa (harina, H₂O) y dejar fermentar. Las masas madre pueden ser o firmes o líquidas dependiendo de la proporción de harina: H₂O que se use: firme, misma proporción; y líquidas, el doble de H₂O que de harina (Corseti, 2013).

La **diversidad** de levaduras y BAL aisladas de masas madre es **enorme** (Minervine *et al.*, 2014). Entre las levaduras, además de *Saccharomyces cerevisiae*, se han aislado especies de los géneros *Kazachstania* (*K. humilis*, *K. bulderi*, o *K. servazzii*), *Pichia* (*P. fermentans*, *P. membranifaciens*, entre otras), *Torulaspora* (*T. delbrueckii*), *Meyerozyma* (*M. guilliermondii* o *M. carophila*) y *Wickerhamomyces* (*W. anomalus*) entre otras (Minervine *et al.*, 2014). Varias de estas levaduras también se han aislado en trabajos realizados en nuestro laboratorio con masas madre (Apartado 3.1 de Materiales y Métodos).

Entre las bacterias, *Lactobacillus fermentum*, *L. paralimentarius*, *L. plantarum*, y *L. sanfranciscensis* son algunas de las BAL más frecuentemente encontradas en masas madre. La proporción de las BAL suele ser de un orden de magnitud mayor que la de levaduras, BAL entre 10⁷-10⁸ y las levaduras entre 10⁶-10⁷ UFC por gramo de masa. Generalmente suele encontrarse una especie de levadura y bacteria, pero pueden convivir en la misma masa varias especies de ambos tipos de microorganismos (De Vuyst *et al.*, 2014).

La fermentación con masa madre confiere a los productos finales características distintivas, mayor complejidad de aromas y sabores, tiempos de vida más largos (más resistentes a la contaminación por bacterias y hongos) y de mayor calidad nutricional (concentraciones más elevadas de sales minerales y aminoácidos) (Gobetti *et al.*, 2014; De Vuyst *et al.*, 2016). La complejidad de aromas y sabores se debe principalmente a propiedades metabólicas y fisiológicas de las levaduras no *Saccharomyces* con un mayor repertorio de rutas metabólicas y enzimas que *S. cerevisiae*. Un ejemplo ilustrativo puede ser la levadura *W. anomalus*, a la cual en el proceso de vinificación se le atribuyen diversos compuestos aromáticos y enzimas (Fig. I.3).

El gluten lo forman cientos de proteínas. Esas proteínas pueden estar como monómeros o unirse entre sí por puentes disulfuro formando oligómeros o polímeros (Grosch y Wieser, 1999). Las **proteínas del gluten se caracterizan** por: **a)** su alto contenido en los aminoácidos prolina (P), glutamina (Q) y, en menor medida, fenilalanina (F) y **b)** escaso contenido de aminoácidos con cadenas laterales cargadas, ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E), lisina (K), arginina (R) e histidina (H) (Wieser, 2007).

Atendiendo a la solubilidad en una solución acuosa de alcohol del 60%, **las proteínas del gluten se dividen en** dos grupos: 1) **gliadinas** o también conocidas como prolaminas, solubles en solución acuosa alcohólica (60%) y 2) **gluteninas** o también denominadas glutelinas, insolubles en dicha solución. (Tabla 1) Aunque ambas fracciones determinan las propiedades reológicas de las masas de panificación sus funciones difieren. Las gliadinas hidratadas contribuyen principalmente a la viscosidad y la plasticidad de la masa, mientras que las gluteninas son responsables de la fuerza y la extensibilidad (Wieser *et al.*, 2007).

Las gliadinas, a su vez, según la secuencia parcial o total de aminoácidos y el peso molecular (Pm), agrupa **cuatro tipos** de proteínas

i) Gliadinas ω 5 (omega5). Están formadas, casi en su totalidad, de secuencias repetidas ricas en los aminoácidos P, Q y F, tales como el octapéptido PQQPFPQQ de trigo. El Pm de las gliadinas ω 5 va desde 60 a 68 kDa.

ii) Gliadinas ω 1,2. Son similares en estructura a las gliadinas ω 5, pero tienen un Pm más bajo, entre 39 y 44 kDa.

iii) Gliadinas α (alfa), a veces denominadas α/β . Tienen menor proporción de aminoácidos P y G que las gliadinas ω . Su extremo N-terminal (40-50% de la proteína) está formado de unidades repetidas de péptidos de más de 10 residuos, ricos en G, P, F y T (tirosina). En las gliadinas α de trigo el péptido que se repite tiene 11 residuos (QPQPFPQQPYP) y generalmente se repite 5 veces. El Pm de las gliadinas α va desde 28 a 35 kDa.

iv) Gliadinas γ , tienen idénticas características que las gliadinas α , pero difiere de ellas en la unidad que se repite y el número de veces que lo hace. En las gliadinas γ se trata de un péptido menor de 7 aminoácidos (QPQPFP) y se repite en torno a 16 veces. El Pm de las gliadinas γ está entre 31 y 35 kDa.

Los dominios C-terminal de las gliadinas α y γ son homólogos, no presentan secuencias repetidas y tienen menor contenido de residuos P y G (Wieser 2007).

En general, las gliadinas α y γ son más abundantes que las gliadinas ω en la fracción total de gliadinas, aunque la presencia y distribución de los cuatro tipos de gliadinas varía entre especies y variedades del cereal e incluso puede variar con las condiciones de cultivo, el tipo de suelo, el clima o los fertilizantes que se empleen (Wieser y Kieffer, 2001; Dubois *et al.*, 2018).

Las gluteninas, son **polímeros de subunidades proteicas unidas por puentes disulfuro**, de alto tamaño molecular. Su Pm va desde 500 a 10^6 kDa, por lo que buena parte de las gluteninas son las proteínas de mayor tamaño que se encuentran en la naturaleza (Wieser, 2007).

La reducción de los enlaces disulfuro genera **dos tipos de subunidades de gluteninas** (SG):

i) SG de bajo Pm o LMW-GS (terminología inglesa). Su Pm está entre 32-39 kDa y tienen una estructura similar a las gliadinas α y γ , aunque difieren en la posición y número de residuos de cisteína; y

ii) SG de alto Pm o HMW-GS. Presentan tamaños entre 67 y 88 kDa, denominándose **x** (x-HMW-GS) a las de mayor tamaño (83-88 kDa) e **y** (y-HMW-GS) a las más pequeñas (67-64 kDa). Las SG de alto

Pm presentan tres dominios estructurales, uno dominio N-terminal sin unidades repetidas (dominio A), un dominio central con repeticiones de unidades ricas en P y G (dominio B) y un dominio C-terminal (dominio C), que, al igual que el dominio A, presenta diferentes aminoácidos cargados y alberga la mayoría de los residuos de cisteína (Wieser *et al.*, 2007).

Aunque genéricamente se emplea el término de gliadinas y gluteninas para referirse a las proteínas del gluten, existen nombres específicos para las proteínas del gluten de los diferentes cereales: secalinas para centeno (secalinas ω , secalinas γ , secalinas de alto Pm, HMW); hordeínas para cebada; y aveninas para avena, quedando en este caso reservados los términos gliadinas y gluteninas para hacer referencia a las proteínas del gluten de trigo (Schalck, 2017).

En esta memoria se utilizará los términos gliadinas y gluteninas para nombrar las proteínas del gluten de los cereales con las que se ha trabajado, tritordeum (\times Tritordeum Ascherson et Graebner) y trigo (*Triticum aestivum*).

Tabla 1. Proteínas del gluten de Trigo

Proteínas del Gluten	Sub tipos	Peso Molecular KDa	Solubilidad	Funcionalidad en la masa
Gliadinas	Gliadinas ω 5	60-68	Solución acuosa 60% etanol	<ul style="list-style-type: none"> • Viscosidad • Elasticidad
	Gliadinas ω 1,2	39-44		
	Gliadinas α	28-35		
	Gliadinas γ	31-35		
Gluteninas	LMW-GS	67-88	Solución Isopropanol-urea-DTT	<ul style="list-style-type: none"> • Fuerza • Extensibilidad
	HMW-GS	32-39		

(Adaptada de Schalk *et al.*, 2017)

I.3.2 PROTEÍNAS DEL GLUTEN POTENCIALMENTE TÓXICAS

El gluten puede resultar tóxico para algunas personas, desencadenando en ellas diferentes patologías. Las enfermedades más comunes relacionadas con la ingesta de gluten son **la alergia al trigo (AT)** y **la enfermedad celiaca (EC)**.

En ambos tipos de enfermedades, la exposición al gluten provoca la activación de las células T (linfocitos) del sistema inmune adaptativo (Sapone *et al.*, 2012; Brietzke *et al.*, 2018). La incidencia es baja, la AT la presenta el 0,5-3% de la población europea o de origen europeo y la EC afecta al 1-2% de la población humana, aunque su prevalencia se ha ido incrementando en el tiempo (Brietzke *et al.*, 2018).

Hay dos tipos de AT que provoca la ingesta de gluten en personas susceptibles a la enfermedad: i) anafilaxia inducida por el ejercicio dependiente de trigo, conocida por las siglas inglesas WDEIA (wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis) y ii) otras reacciones inmunológicas adversas, dermatitis atópica, urticarias y anafilaxis (Sapone *et al.*, 2012). Ambos tipos de AT son reacciones inmunológicas mediadas por la unión de inmunoglobulina E (IgE) a proteínas del gluten que llevan la secuencia SQQQPPF, provocando la liberación de histamina de células basófilas y mastocitos del sistema inmune.

Las proteínas del gluten desencadenantes de AT varían con la edad y los síntomas de los pacientes. Los estudios con proteínas purificadas del gluten y suero de pacientes han revelado que las **gliadinas ω 5** están implicadas en todas las anafilaxis, incluida la WDEIA, y el 55% de urticarias. Mientras que otros

cuadros clínicos están mediados por **gliadinas α y LMW-SG** (60%), **gliadinas γ** (55%), **gliadinas ω** (48%) o **LMW-SG** (60%) (Tatham y Shewry, 2008; Sapone *et al.*, 2012). En la gliadina ω 5 se han identificado 7 epítomos (QQIPQQQ, QQLPQQQ, QQFPQQQ, QQSPEQQ, QQSPQQQ, QQYPQQQ and PYPP) con alta capacidad alergénica, de los cuales 4 son dominantes (QQIPQQQ, QQFPQQQ, QQSPEQQ y QQSPQQQ) (Tatham y Shewry, 2008).

La EC se trata de una enfermedad autoinmune en la que el paciente desarrolla anticuerpos contra: a) la transglutaminasa tisular (TGt) en el intestino delgado; b) el endomisio, que rodea cada una de las fibras del músculo liso del intestino; y c) péptidos desaminados de gliadinas.

Las proteínas del gluten desencadenantes de la EC pertenecen al grupo de las gliadinas α . Aunque hay más de 50 epítomos de gliadinas α que activan las células T, **el epítomo más inmunogénico es el péptido 33-mer LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF** del subtipo **de gliadina α 2 de trigo** (Tabla 1), el cual es resistente a la acción de proteasas gástricas, pancreáticas y de las vellosidades intestinales. Además, la desaminación de algunos residuos Q del péptido 33-mer lo convierten en un potente estimulador de las células T que llevan el antígeno leucocitario humano DQ2 o DQ8 encontrados en la gran mayoría de los pacientes celíacos (Sahn *et al.*, 2002).

La secuencia del péptido 33-mer se ha identificado en las proteínas de los cereales que son tóxicos para las personas con la EC, pero no en aquellos otros cereales que pueden estar presentes en la dieta celíaca, avena, maíz o arroz. Actualmente, en las pruebas serológicas, ya sea para el diagnóstico de la EC o la detección de gluten en alimentos, se emplea el péptido 33-mer desaminado o versiones recombinantes similares, contra el cual se han desarrollado anticuerpos policlonales y monoclonales comerciales.

Además de la AT y la EC, hay personas que presentan **sensibilidad al gluten (SG)**. La ingesta de gluten provoca en los pacientes la aparición de trastornos intestinales y no intestinales similares a los de los pacientes con la EC (diarrea crónica, pérdida de peso, anemia o desórdenes neuronales). Sin embargo, los pacientes con SG no presentan ni reacciones alérgicas ni de autoinmunidad, pero no se conocen las proteínas del gluten implicadas en esa patología. El diagnóstico se basa en criterios de exclusión, eliminando de la dieta los alimentos con gluten, seguido de la evaluación de la mejora o no del cuadro clínico del paciente (Sapone *et al.*, 2012).

I.3.3 DETOXIFICACIÓN DEL GLUTEN

Reducir o eliminar el gluten de la dieta puede convertirse en una necesidad vital, especialmente para aquellas personas que presentan los cuadros clínicos más adversos tras la ingesta de gluten, como sucede en las personas que tienen la EC.

Son muchos los productos alimenticios que llevan gluten. Generalmente se considera que el pan, la pasta, los productos de repostería y la cerveza son los alimentos que contienen gluten. Sin embargo, debido a sus propiedades viscoelásticas se añade de forma rutinaria a una gran variedad de alimentos procesados, desde salsas hasta carnes y pescados (Brietzke *et al.*, 2018). Además, también se puede encontrar en algunos medicamentos acompañando al almidón que se agrega como excipiente.

Consecuentemente, peptidasas capaces de degradar proteínas del gluten se propusieron originalmente como una opción terapéutica para la EC. Uno de los trabajos pioneros fue el realizado con una propyl endopeptidasa (PEP) de *Flavobacterium meningosepticum* (ATCC® 13253), cuyos autores demostraron que era capaz de hidrolizar el péptido 33-mer de la gliadina α 2 y que el tratamiento del

péptido con PEP reducía en un corto periodo de tiempo la estimulación de células T (Sahn *et al.*, 2002). Desde entonces, la búsqueda de **glutenasas**, peptidasas capaces de detoxificar gluten de los alimentos no ha cesado.

Glutenasas que hidrolizan gluten, y en particular el péptido 33-mer, se han aislado de numerosas fuentes (Scherf *et al.*, 2018): a) plantas (granos germinados de cereales, cebada, látex de papaya); b) hongos (*Aspergillus niger*, *A. oryzae*); c) bacterias del suelo (*Myxococcus xanthus*), de humanos (*Rothia mucilaginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*) y de insectos (*Bacillus* sp.); d) escarabajos (*Rizopertha dominica*); y d) masas madre. Sin embargo, sólo las peptidasas de hongos (*A. niger*, *A. oryzae*) se emplean en el procesamiento de alimentos, ya que hasta la fecha son las únicas reconocidas como seguras, por la FDA (Food and Drug Administration) en Estados Unidos y la EFSA (European Food Safety Authority) en Europa. También una PEP de *A. niger* está disponible en el mercado como suplemento dietético, no para reemplazar la dieta libre de gluten o para tratar o prevenir la EC sino para inactivar trazas de gluten que puedan estar presentes en aquellos supuestos alimentos libres de gluten (Scherf *et al.*, 2018).

Por otro lado, las masas madre, harina fermentada con alta densidad de bacterias del ácido láctico (BAL) y levaduras, usadas como iniciadores o starters para fermentar masas panarias (Minervine *et al.*, 2014), son actualmente consideradas como una buena herramienta tecnológica para la elaboración de productos libres de gluten o GF (de la terminología inglesa *gluten free*) (Gobbetti *et al.*, 2019).

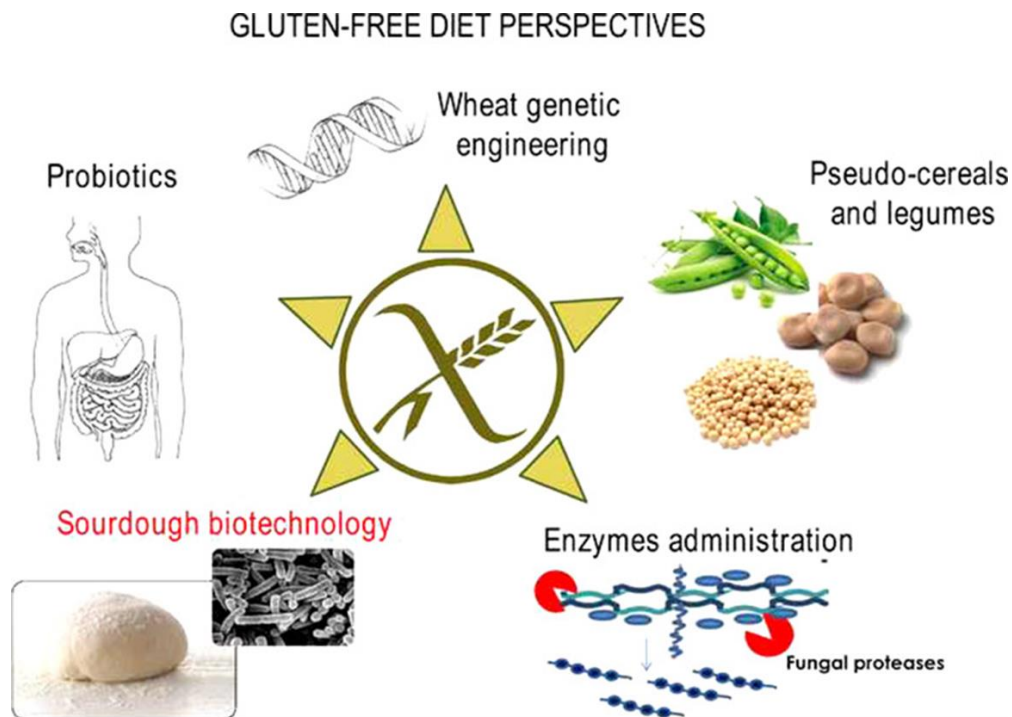
Los primeros trabajos que evidenciaron la capacidad de las masas madre para hidrolizar proteínas del gluten de trigo datan de hace más de dos décadas, en los que se demostró: 1) qué la combinación de bacterias lácticas (*Lactobacillus* spp.) de masas madre eran capaces de degradar más del 50% del gluten de trigo (Di Cagno *et al.*, 2002) y 2) que la fermentación por una combinación de 4 bacterias lácticas de una mezcla de harinas con gluten (trigo) y sin gluten (avena, mijo, y alforfón) permitía obtener pan que no producía ninguna reacción adversa en pacientes con la EC (Di Cagno *et al.*, 2004).

Trabajos posteriores han revelado que fermentaciones especiales con masas madre, bien sea empleando harina de granos de trigo germinados o añadiendo proteasas comerciales permiten obtener productos con cantidades residuales de gluten que parecen ser seguros para ser incorporados a dietas GF (Scherf *et al.*, 2018; Gobbetti *et al.*, 2019).

Además, la fermentación con masas madre de harina GF (maíz y arroz, pseudocereales, amaranto, quinoa y soja, y legumbres) no sólo mejora las propiedades reológicas de extensibilidad y viscosidad de las masas GF, sino que también contribuye a incrementar el valor nutricional del pan y productos de bollería derivados de esas masas, productos que, además, son preferidos por las personas que llevan una dieta estricta GF, ya que se caracterizan por tener mejor gusto o palatabilidad (Gobbetti *et al.*, 2019).

Si bien, las BAL son los microorganismos empleados en la degradación del gluten, lo cierto es que una gran variedad de levaduras puede estar acompañando a las BAL en las fermentaciones de las masas madre (De Vuist *et al.*, 2014; Gobbetti *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta la fecha, la posible contribución de las levaduras de masa madre a la hidrólisis del gluten no ha sido analizada.

En la Figura 1.4 se recogen las diferentes estrategias a seguir para lograr una dieta libre de gluten.



Tomada de Gobbetti et al., 2019, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.010>

Figura I.4. Estrategias para mantener una dieta libre de gluten.

I.4. EL ÁCIDO FÍTICO

El ácido fítico (AF), myo-inositol hexafosfato (IP6), es ácido orgánico formado por seis moléculas de fosfato (P) y una de inositol (Anderson, 1914) (Fig. I5). Representa el 60-90% del fósforo inorgánico del grano de cereal y otras semillas de plantas, legumbres y oleaginosas.

Es **abundante** en cereales (trigo, centeno, cebada, entre otros) en los que llega alcanzar valores de 10 a 14 g de AF /kg (Tabla 2). En los granos del cereal se encuentra mayoritariamente en las capas más externas, por lo que su contenido es alto en las **harinas integrales** (Fig. I1.) También abunda en plantas que se emplean en la alimentación animal, legumbres, semillas oleaginosas y maíz (Neira *et al.*, 2013).

Tabla 2. Contenido de Ácido Fítico en grano de cereales

Material	Contenido de ácido fítico g/Kg ⁻¹
Triticale	14.91
Cebada	11.92
Centeno	11.92
Trigo	10.934
Maíz	9.94
Avena	9.44
Habas	7.45

Fuente: Vallardi *et al.* (2002).

Las funciones del ácido fítico en plantas no están completamente definidas, se han asociado principalmente a: reserva energética, fuente de cationes, reserva de fósforo y en semilla se le relaciona con el proceso de la germinación y fuente de myo-inositol (Neira *et al.*, 2013). También se le han dado otras funciones tales como precursor de polisacáridos de la pared celular y como antioxidante, pues se ha visto que previene la peroxidación de los lípidos en las plantas, aumentando la longevidad de las semillas (Méndez, 2007).

EL AF es un **factor antinutricional** porque es un **agente quelante** o secuestrante de iones metálicos tales como el zinc, hierro, calcio, magnesio, entre otros, disminuyendo la biodisponibilidad de esos minerales. Además, su presencia en el tracto gastrointestinal **provoca una menor absorción de aminoácidos** que son esenciales tomarlos en la dieta, al inhibir el AF la acción de proteasas. También el AF **impide la absorción de P** (Dvoràjová, 1998, Godoy *et al.*, 2010). El hombre, al igual que los animales monogástricos, no tiene enzimas específicas para la hidrólisis del AF, por lo que un alto contenido en la dieta de AF conduce a la desnutrición.

En las granjas de cría de animales el AF genera un doble problema. Por un lado, se hace necesario suplementar la dieta con fósforo inorgánico (Pi) para cubrir el requerimiento nutricional del animal, incrementando los costes de producción, pero por otro lado las cantidades de P que no son aprovechadas por el animal son excretadas, pasando al medio ambiente **contribuyendo a la eutrofización** de los suelos (Bedford y Partridge *et al.*, 2010).

Debido al carácter antinutricional del AF, existe la necesidad de enzimas que hidrolicen el AF y que puedan ser usadas en la alimentación humana y animal para contrarrestar los efectos adversos de AF en la nutrición y el medio ambiente (Bohn *et al.*, 2008).

Además, las fitasas tienen interés para la producción industrial de myo-inositol y también de sus intermediarios fosforilados, los cuales juegan un papel muy importante en las vías de señalización celular, por lo que hay una gran demanda. Su uso también se ha extendido a las fermentaciones y a la biodegradación de plaguicidas organofosforados (metil paratión, o monocrotofos), lográndose con algunas fitasas degradar de hasta el 72% del pesticida. (Shah *et al.*, 2017).

I.4.1 LAS FITASAS

El origen de las enzimas fitasas (myo-inositol [1, 2, 3, 4, 5, 6] *hexakis* fosfato fosfohidrolasas) se remonta a más de un siglo (1907), sólo cuatro años después de que se reportara científicamente la descripción del ácido fítico (Lei *et al.*, 2003). Son una familia de proteínas capaces de catalizar la hidrólisis gradual del IP6 y generar como productos finales, inositol-5 fosfato (IP5), inositol-4 fosfato (IP4), inositol-3 fosfato (IP3), inositol-2 fosfato (IP2), inositol-1 fosfato fosfatos inorgánicos (Pountillart *et al.*, 1994).

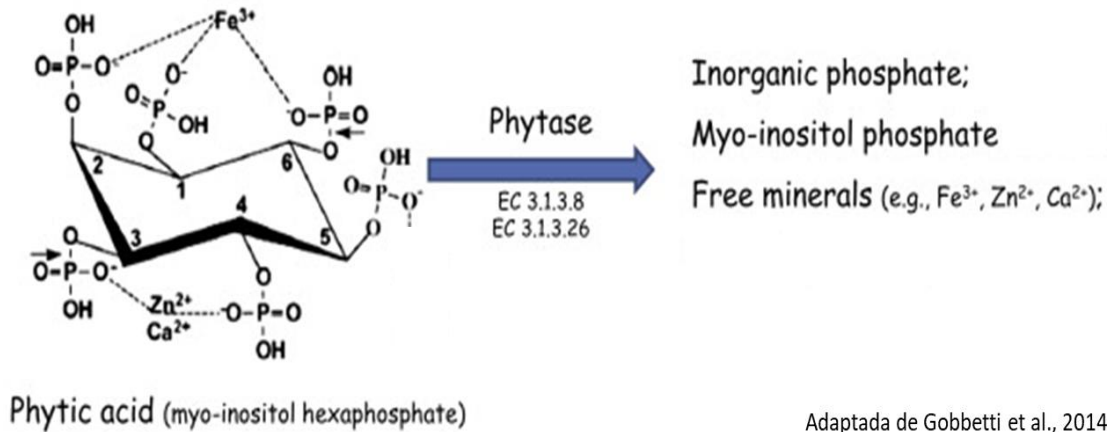


Figura I.5. Reacción catalizada por la enzima fitasa. Se muestra la numeración de los residuos de fosfato y las posiciones por la que inician la desfosforilación (flechas) las fitasas, posición 3 microorganismos (EC 3.1.3.26) y posición 6 plantas (EC 3.1.3.26).

Las fitasas están presentes de forma ubicua en plantas, animales y microorganismos. Se pueden clasificar en base a su regioselectividad en 3, 5, y 4-6-fitasas de acuerdo con la IUPAC-IUB (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada y la Unión Internacional de Bioquímica). Las 3- fitasas inician la desfosforilación en la posición 3 del myo-inositol y se han encontrado en animales y microorganismos. Las 4-6-fitasas están presentes en plantas y comienzan la hidrólisis en la posición 4 ó 6. Las 5-fitasas hidrolizan el fosfato a partir del carbono 5 del anillo de myo-inositol (Fig. I5) (Bei *et al.*, 2009).

También se pueden agrupar las fitasas de acuerdo con el pH óptimo de actuación (ácidas o alcalinas) o el mecanismo catalítico (histidina ácido fosfatasas (HAPs), fosfatasas de hélice β (BPP) y fosfatasas ácidas púrpura (PAP) (Fig. I6) (Oh, *et al.*, 2004; Correa, de Araújo, 2020).

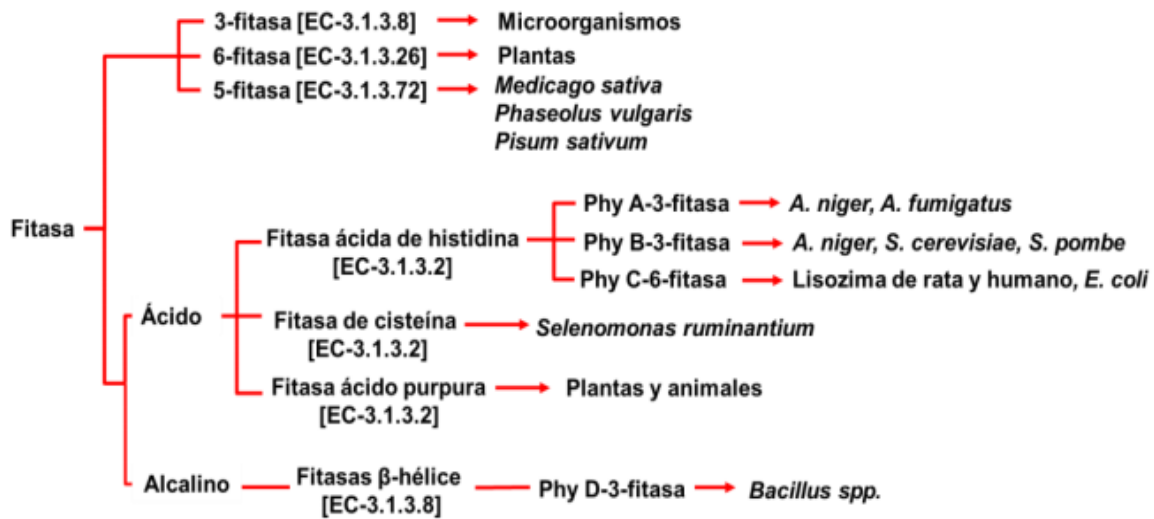


Figura I.6. Clasificación de las enzimas fitasa. Se muestra las enzimas de cada grupo y la procedencia (Cao *et al.*, 2007).

I.4.1.1 FITASAS ACIDAS DE HISTIDINA HRP

La mayoría de las fitasas procedentes de bacterias, hongos y plantas se clasifican dentro de esta categoría. Se caracterizan porque todos los miembros poseen el motivo RHGXRXP en el extremo NH₂ y el dipéptido HD catalíticamente activo en el extremo C-terminal. El residuo de histidina (H) genera un intermedio de fosfohistidina mientras que el residuo de ácido aspártico (D) dona protones al oxígeno del enlace fosfomonoéster, liberando así fosfato del ácido fítico.

Las HAPs pueden iniciar la hidrólisis del AF en la posición C3 o C6 del anillo de myo-inositol, produciendo inositol monofosfato, liberando cinco de seis P del anillo de AF (Fig. I5). Al parecer este grupo de fitasas prefieren los grupos ecuatoriales siendo incapaces de actuar sobre los axiales por lo que es difícil que por su acción el AF vaya hasta myo-inositol (Oh *et al.*, 2006).

La clase de las HAP se dividen en tres grupos, Phy A, Phy B y Phy C, atendiendo a la homología en la secuencia de aminoácidos, pH al que hidrolizan el AF y la posición específica del myo-inositol en que inician la hidrólisis. Dentro de las Phy A, (3-fitasa) se encuentran proteínas con 465-469 aminoácidos. A este grupo pertenece la fitasa Phy A de *Aspergillus niger*, poseen pH de 2.5-5.5 con temperatura óptima de 55-60 °C. Su peso molecular sin glicosilar es de 48-50 KDa, sin embargo, el peso molecular aparente determinado por DSD- PAGE puede variar de 62-128 KDa. Presentan actividad frente en un amplio rango de sustratos fosforilados (Wyss *et al.*, 1999).

Las Phy B, tienen un porcentaje de identidad con las Phy A de 23.5% y 46% de similitud (sustituciones neutras) con características de tamaño, pH y temperatura similares a Phy A. (Kostrewa *et al.*, 1999; Wyss *et al.*, 1999).

Las enzimas Phy C (6-fitasas) incluyen las fitasas ácidas de *E. coli*, proteínas monoméricas no glicosiladas e intracelulares, con rangos de acción entre 5-6 de pH y temperatura de 40-60 °C, con secuencia de 354-439 aminoácidos y peso molecular de 42-45 KDa. Las enzimas de este grupo son capaces de hidrolizar el fitato libre a pH ácido y otros ésteres de fosfato (Wyss *et al.*, 1999).

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS

El trabajo realizado se encuadra dentro de un proyecto en desarrollo, en colaboración con otros laboratorios y empresas, cuya finalidad es contribuir a la innovación en el sector de la panificación mediante el desarrollo de inóculos fermentativos formados por levaduras y bacterias lácticas que reproduzcan las características de las masas madre, siendo el **objetivo principal** de este trabajo de tesis doctoral la **identificación y caracterización de levaduras** que estuviesen **dotadas de actividades enzimáticas de interés en panificación**. Para lograr ese objetivo se establecieron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Aislar y caracterizar las proteínas del gluten en harinas empleadas en el sector de la panificación.
2. Identificar, entre un grupo discreto de levaduras aisladas de masas madre, levaduras con actividad glutenasa, capaces de hidrolizar proteínas del gluten.
3. Valorar el impacto de la actividad glutenasa en el proceso de fermentación.
4. Establecer la efectividad de la actividad glutenasa en la reducción de proteínas inmunogénicas en pan.
5. Identificar, entre cepas representativas de nueve especies diferentes, levaduras con actividad fitasa, capaces de hidrolizar ácido fítico.
6. Caracterizar la actividad identificada a fin de poder evaluar su funcionalidad en la fermentación de harinas.

