

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Nutrición y Bromatología II



**CARACTERIZACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE PÉPTIDOS  
OBTENIDOS A PARTIR DE PROTEÍNAS LÁCTEAS  
MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y PROCESOS  
FERMENTATIVOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

Blanca Hernández Ledesma

Bajo la dirección de las Doctoras:

Lourdes Amigo Garrido  
María Isidra Recio Sánchez

**Madrid, 2002**

**ISBN: 84-669-2033-1**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II



**CARACTERIZACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE PÉPTIDOS  
OBTENIDOS A PARTIR DE PROTEÍNAS LÁCTEAS  
MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y PROCESOS  
FERMENTATIVOS**



**BLANCA HERNÁNDEZ LEDESMA**  
INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CSIC)

Madrid, 2002

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II

**CARACTERIZACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE PÉPTIDOS  
OBTENIDOS A PARTIR DE PROTEÍNAS LÁCTEAS  
MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y PROCESOS  
FERMENTATIVOS**

Memoria que para optar al grado de  
DOCTOR EN FARMACIA  
Presenta

**BLANCA HERNÁNDEZ LEDESMA**

DIRECTORAS:  
DRA. LOURDES AMIGO GARRIDO  
DRA. M<sup>a</sup> ISIDRA RECIO SÁNCHEZ

INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CSIC)

**LOURDES AMIGO GARRIDO, CIENTÍFICA TITULAR DEL INSTITUTO DE  
FERMENTACIONES INDUSTRIALES DEL CSIC Y M<sup>a</sup> ISIDRA RECIO  
SÁNCHEZ, CIENTÍFICA TITULAR DEL INSTITUTO DE FERMENTACIONES  
INDUSTRIALES DEL CSIC**

CERTIFICAN,

Que el presente trabajo titulado “Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas mediante hidrólisis enzimática y procesos fermentativos” y que constituye la Memoria que presenta la Licenciada Blanca Hernández Ledesma para optar al grado de doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Caracterización de Alimentos del Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC.

Madrid, 6 de septiembre de 2002

Fdo. Lourdes Amigo Garrido

Fdo. M<sup>a</sup> Isidra Recio Sánchez

*La vida sólo puede ser comprendida hacia atrás,  
pero únicamente puede ser vivida hacia adelante*

Kierkegaard

*A Miguel,  
a mis padres y mis hermanos*

## **AGRADECIMIENTOS**

*El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el Instituto de Fermentaciones Industriales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) bajo la dirección de la Dra. Lourdes Amigo Garrido y la Dra. M<sup>a</sup> Isidra Recio Sánchez, Científicas Titulares de dicho Instituto. Quiero agradecerles, tanto mi formación investigadora como el respaldo y el apoyo mostrados durante la elaboración de esta Tesis.*

*Agradezco a la Dra. M<sup>a</sup> Luisa Pérez Rodríguez, Profesora titular del Dpto. de Nutrición y Bromatología II de la Facultad de Farmacia (UCM) y ponente de esta tesis, la ayuda prestada en todo momento.*

*Este trabajo ha sido posible gracias a la concesión de una beca predoctoral de Formación del Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Cultura. Mi reconocimiento al Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC, y como directora a la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Polo y posteriormente a la Dra. Lourdes Amigo Garrido, por los recursos técnicos y humanos puestos al alcance para mi formación académica y científica.*

*Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Mercedes Ramos, cuyos consejos y experiencia me han acompañado desde el inicio de este trabajo.*

*Agradecer también la ayuda desinteresada mostrada en todo momento a los Drs. Encarna Pueyo, Elena Molina, Josefina Belloque, M<sup>a</sup> Victoria Moreno, Rosina López, Mar Villamiel, Nieves Corzo y Agustín Olano, cuyas enseñanzas han permitido el buen fin de esta memoria.*

*Quiero expresar mi gratitud a los compañeros con los que comencé en el mundo de la ciencia, Miriam, María, Gonzalo, Adolfo, Mónica y Beatriz, ya "doctores de prestigio", y José Angel, futuro doctor, por los buenos momentos pasados en el laboratorio. Agradecer también a la nueva generación de investigadores, Marta, Ana, Iván y Rosa, el apoyo mostrado desde su reciente incorporación al grupo de trabajo.*

*Mi sincero agradecimiento a las Doctoras y becarios del laboratorio de Productos de Origen Vegetal, por las facilidades prestadas que me han hecho muy agradables las horas de trabajo pasadas en él. Igualmente, quiero agradecer al grupo de Microbiología y en especial a Rosario Muñoz, sus enseñanzas y su colaboración con las bacterias lácticas.*

*Agradezco también a Constanza, José Antonio, Conchita, Leticia, Angelines, M<sup>a</sup> Luisa, Jose Luis, Antonio y a todas aquellas personas del Instituto que se han cruzado en mi camino y que de manera técnica y/o personal me han facilitado el trabajo.*



*Esta tesis está dedicada a aquellas personas que más de cerca han vivido los momentos más prósperos y también los más difíciles de este trabajo, mi familia. Agradecer a mis padres el esfuerzo realizado desde hace tantos años, esperando que esta Tesis sea su recompensa. A Jesús y Ana, los mejores hermanos que nadie pueda imaginar, cuyos consejos y su cariño han estado siempre a mi lado y a Paula, que aún en la distancia ha sido juguete en los momentos de descanso y liberación.*

*En especial, está dedicado a ti, Miguel, por entender y apoyar en todo momento este sueño, compartiendo mis alegrías con satisfacción y sobrellevando mis disgustos con paciencia, haciendo feliz cada instante de mi vida a tu lado.*

## **INDICE GENERAL**

<b>RESUMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>13</b>
<b>INDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	<b>17</b>
<b>OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO</b> .....	<b>25</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>29</b>
<b>1.1. COMPOSICIÓN PROTEICA DE LA LECHE</b> .....	<b>31</b>
1.1.1. Proteínas de suero .....	31
1.1.1.1. $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) .....	32
1.1.1.2. $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La) .....	34
1.1.1.3. Seroalbúmina (BSA) .....	35
1.1.1.4. Inmunoglobulinas (Ig) .....	35
1.1.1.5. Lactoferrina (Lf) .....	35
1.1.2. Caseínas .....	36
<b>1.2. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS PÉPTIDOS LÁCTEOS</b> .....	<b>38</b>
1.2.1. Actividad opiácea .....	38
1.2.2. Actividad antitrombótica .....	40
1.2.3. Actividad inmunomodulante .....	41
1.2.4. Actividad antimicrobiana .....	42
1.2.5. Actividad quelante de metales .....	43
1.2.6. Actividad antihipertensiva .....	43
1.2.7. Otras actividades biológicas .....	44
<b>1.3. PÉPTIDOS LÁCTEOS CON ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ACE)</b> .....	<b>46</b>
1.3.1. Actividad de la ACE. Relación estructura/actividad de los péptidos inhibidores de la ACE .....	46
1.3.2. Péptidos lácteos inhibidores de la ACE obtenidos mediante hidrólisis enzimática .....	48
1.3.2.1. Hidrólisis con enzimas digestivas .....	48
1.3.2.2. Hidrólisis con enzimas microbianas .....	52
1.3.3. Péptidos lácteos inhibidores de la ACE obtenidos mediante procesos fermentativos .....	54
1.3.3.1. Péptidos inhibidores de la ACE en leches fermentadas .....	55

1.3.3.2 Péptidos inhibidores de la ACE en quesos .....	58
1.3.4. Péptidos lácteos inhibidores de la ACE obtenidos mediante síntesis química .....	60
1.3.5. Otras estrategias de obtención e identificación de péptidos lácteos inhibidores de la ACE .....	63
1.3.6. Efectos <i>in vivo</i> de los péptidos lácteos inhibidores de la ACE .....	65
1.3.7. Perspectivas futuras de los péptidos bioactivos. Alimentos funcionales .....	67
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>71</b>
<b>2.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA ACE DERIVADOS DE LA <math>\beta</math>-LG OVINA Y CAPRINA</b> .....	<b>73</b>
2.1.1. Muestras .....	73
2.1.2. Obtención y análisis de la $\beta$ -Lg ovina y caprina .....	73
2.1.2.1. Determinación de proteína mediante el método del ácido bicinonínico (BCA) .....	74
2.1.2.2. Cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa .....	74
2.1.2.3. Isoelectroenfoque (IEF) .....	75
2.1.2.4. Electroforesis capilar (EC) .....	76
2.1.3. Hidrólisis de la $\beta$ -Lg ovina y caprina .....	76
2.1.4. Determinación de la actividad inhibitoria de la ACE .....	77
2.1.5. Aislamiento y caracterización de péptidos inhibidores de la ACE del hidrolizado de la $\beta$ -Lg caprina por la termolisina .....	79
2.1.5.1. Aislamiento de péptidos mediante RP-HPLC .....	79
2.1.5.2. Caracterización del hidrolizado mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas .....	80
2.1.5.3. Identificación de péptidos mediante ESI-MS y secuenciación de aminoácidos .....	80
2.1.5.4. Síntesis de péptidos inhibidores de la ACE .....	81
<b>2.2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA <math>\beta</math>-LG BOVINA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES</b> .....	<b>82</b>
2.2.1. Hidrólisis de la $\beta$ -Lg A bovina en condiciones desnaturalizantes .....	82

2.2.2. Análisis de los hidrolizados mediante RP-HPLC y HPLC-ESI-MS .....	82
2.2.3. Aislamiento y caracterización de las fracciones peptídicas mediante RP-HPLC y ESI-MS .....	83
<b>2.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ACE EN PRODUCTOS LÁCTEOS COMERCIALES .....</b>	<b>84</b>
2.3.1. Productos lácteos comerciales .....	84
2.3.2. Obtención del extracto soluble en agua .....	84
2.3.3. Determinación del nitrógeno total y del nitrógeno amínico .....	88
2.3.4. Determinación de la actividad inhibitoria de la ACE .....	88
2.3.5. Análisis del extracto soluble en agua mediante RP-HPLC .....	88
2.3.6. Simulación de la digestión gastrointestinal de productos lácteos fermentados y de leches maternizadas .....	89
2.3.7. Aislamiento de péptidos inhibidores de la ACE a partir de un producto lácteo fermentado .....	90
<b>2.4. PREPARACIÓN DE LECHES FERMENTADAS CON ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ACE .....</b>	<b>93</b>
2.4.1. Bacterias lácticas .....	93
2.4.2. Curvas de crecimiento .....	94
2.4.3. Fermentación de la leche y del concentrado de proteínas de suero .....	94
2.4.4. Determinación de la actividad inhibitoria de la ACE .....	95
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>97</b>
<b>3.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA ACE DERIVADOS DE LA <math>\beta</math>-LG OVINA Y CAPRINA .....</b>	<b>99</b>
3.1.1. Obtención y análisis de la $\beta$ -Lg ovina y caprina .....	99
3.1.2. Hidrólisis de la $\beta$ -Lg ovina y caprina. Análisis de los hidrolizados mediante RP-HPLC .....	103
3.1.2.1. Perfil peptídico de los hidrolizados .....	106
3.1.3. Determinación de la actividad inhibitoria de la ACE .....	113
3.1.4. Caracterización del hidrolizado de la $\beta$ -Lg caprina por la termolisina mediante HPLC-ESI-MS .....	125

3.1.5. Aislamiento y caracterización de péptidos inhibidores de la ACE del hidrolizado de la $\beta$ -Lg caprina por la termolisina .....	128
<b>3.2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA <math>\beta</math>-LG BOVINA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES .....</b>	<b>137</b>
3.2.1. Caracterización de los hidrolizados mediante HPLC-ESI-MS .....	142
<b>3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ACE EN PRODUCTOS LÁCTEOS COMERCIALES .....</b>	<b>150</b>
3.3.1. Actividad inhibitoria de la ACE en leches fermentadas .....	150
3.3.2. Actividad inhibitoria de la ACE en leches maternizadas .....	158
3.3.3. Actividad inhibitoria de la ACE en quesos frescos y mousses de quesos frescos .....	163
3.3.4. Simulación de la digestión gastrointestinal de productos lácteos fermentados y de leches maternizadas .....	167
3.3.4.1. Simulación de la digestión gastrointestinal de productos lácteos fermentados .....	169
3.3.4.2. Simulación de la digestión gastrointestinal de leches maternizadas .....	173
3.3.5. Aislamiento de péptidos inhibidores de la ACE en un producto lácteo fermentado .....	178
<b>3.4. PREPARACIÓN DE LECHE FERMENTADAS CON ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ACE .....</b>	<b>187</b>
3.4.1. Fermentación de leche UHT .....	191
3.4.2. Fermentación de un concentrado de proteínas de suero .....	194
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>201</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>205</b>

## **RESUMEN**

En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo el estudio de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) de péptidos procedentes de las proteínas lácteas, obtenidos mediante procesos de hidrólisis enzimática y procesos de fermentación microbiana. Esta Tesis se ha estructurado en cuatro secciones.

En la primera parte se ha evaluado la formación de péptidos con actividad inhibitoria de la ACE a partir de  $\beta$ -Lg ovina y caprina procedente de suero ácido y dulce, tras la hidrólisis con enzimas de origen digestivo y microbiano. El estudio de la actividad inhibitoria de la ACE en los hidrolizados obtenidos, en función tanto del tiempo de incubación como de la concentración proteica, y la determinación del valor del  $IC_{50}$  se realizó tras la optimización del método espectrofotométrico aplicado a tal fin. Además, se han aislado mediante sucesivas etapas de cromatografía de líquidos, algunos de los fragmentos peptídicos responsables de la actividad inhibitoria de la ACE determinada en el hidrolizado de la  $\beta$ -Lg caprina por la termolisina. La identificación y caracterización de dichos péptidos se ha realizado mediante distintas técnicas, como la espectrometría de masas, la secuenciación de aminoácidos y la síntesis química de los péptidos. Se han identificado dos nuevas secuencias peptídicas, LLF y LQKW, no descritas anteriormente en la bibliografía y que presentaron valores notables de actividad inhibitoria de la ACE.

En la segunda parte de esta memoria se ha evaluado la actividad proteolítica de la termolisina sobre la  $\beta$ -Lg bovina bajo diferentes temperaturas, ya que las proteasas pueden actuar sobre distintas regiones, dependiendo del estado conformacional de la proteína. Se ha empleado la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas para llevar a cabo la identificación de péptidos cuya velocidad de formación o de hidrólisis o cuya concentración depende de la temperatura de incubación. Así, se han identificado tres fragmentos que no se originan a 37°C y sí aparecen a temperaturas de incubación iguales o superiores a 50°C. De manera similar, se han identificado cinco péptidos, que si bien se forman por acción de la termolisina a 37°C, la velocidad de hidrólisis se incrementa al aumentar la temperatura de incubación de la  $\beta$ -Lg bovina con dicha enzima.

En la tercera y cuarta parte de esta memoria se ha iniciado el estudio de otra de las estrategias empleadas en la obtención de péptidos con actividad inhibitoria de la ACE a partir de proteínas lácteas, la fermentación microbiana. Para ello, en la tercera sección, se



ha llevado a cabo un estudio de la posible actividad inhibitoria de la ACE en distintos productos lácteos comerciales, como leches fermentadas y leches maternizadas, quesos frescos y mousses de quesos frescos, estudiando la relación entre dicha actividad y algunas características del producto, como la concentración peptídica, el grado de hidrólisis y/o el perfil cromatográfico. Algunos productos comerciales presentaron valores elevados de la relación de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al contenido de nitrógeno peptídico, lo que pone de manifiesto la formación de péptidos con potente actividad inhibitoria durante la fermentación de la leche. En concreto, a partir de uno de los productos lácteos fermentados y mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, se ha identificado el tri-péptido VPP, descrito hasta el momento como uno de los péptidos de mayor actividad inhibitoria de la ACE *in vitro* y efecto antihipertensivo *in vivo*.

Además, la simulación de la digestión gastrointestinal de cuatro productos comerciales, dos productos lácteos fermentados y dos leches maternizadas, ha permitido estudiar la variación de la actividad inhibitoria de la ACE en dichos productos tras el paso de los mismos por el tracto digestivo. Se ha observado la persistencia o el incremento de la actividad inhibitoria de la ACE tras dicha simulación, lo que pone de manifiesto la resistencia de los péptidos bioactivos formados durante la elaboración de los productos y/o la formación de nuevos péptidos inhibidores de la ACE tras la acción de las enzimas digestivas.

En la cuarta sección de esta memoria, se ha realizado un estudio preliminar para el desarrollo de alimentos fermentados con actividad inhibitoria de la ACE. Para ello, se la llevado a cabo la fermentación de leche y de un concentrado de proteínas de suero con distintas cepas de bacterias lácticas, evaluando el efecto de la cepa bacteriana responsable del proceso de fermentación y de las condiciones de dicho proceso sobre la actividad inhibitoria de la ACE del producto fermentado obtenido. Las muestras de leche fermentadas con *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus helveticus* fueron las que presentaron mayores porcentajes de inhibición de la ACE. Aunque los resultados de esta parte son muy preliminares, la estrategia de fermentación podría emplearse en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales encaminados a la prevención y/o tratamiento de la hipertensión.

In this thesis, the angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory activity of peptides derived from milk proteins by enzymatic hydrolysis and fermentative processes was studied. This memory is structured in four sections.

The first section describes the results concerning the ACE-inhibitory activity of peptides obtained from ovine and caprine  $\beta$ -Lg by hydrolysis with digestive and microbial enzymes. Caprine and ovine  $\beta$ -Lg was purified from sweet and acid whey. The effect of the incubation time and the protein concentration on the ACE-inhibitory activity (expressed as  $IC_{50}$ ) of the hydrolysates was followed by a spectrophotometric method optimised for this purpose. Several ACE-inhibitory peptides were isolated and characterised in a hydrolysate of caprine  $\beta$ -Lg digested with thermolysin through successive stages of liquid chromatography. Identification and characterisation of these peptides was performed through different techniques, such as mass spectrometry, amino acid sequencing, and chemical synthesis of peptides. Two new peptides, LLF and LQKW, with potent ACE-inhibitory activity were identified. These sequences had not been previously described in the literature as ACE-inhibitors.

Because proteases are able to hydrolyse different zones depending on the conformational state of the protein, in the second section, proteolytic activity of thermolysin on  $\beta$ -Lg under different incubation temperatures was evaluated. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry was used for peptide identification. Three fragments, which were not found after incubation at 37°C, were identified at incubation temperatures equal or higher than 50°C. In a similar way, five peptides, which were produced by the action of thermolysin at 37°C, were more rapidly formed when the incubation temperature of the bovine  $\beta$ -Lg with thermolysin increased.

In the third and fourth sections, the microbial fermentation was evaluated as an alternative strategy to obtain ACE-inhibitory activity peptides derived from milk proteins. In the third section, a screening of the ACE-inhibitory activity in different commercial milk products, such as, fermented milks, infant formulas, fresh cheeses and mousses was performed. The relation between the ACE-inhibitory activity and some characteristics of the products, such as, peptidic concentration, hydrolysis degree, and the chromatographic pattern was studied. Some commercial products showed high ratio values of ACE-

inhibitory activity with regard to peptidic nitrogen content, demonstrating the formation of peptides with potent inhibitory activity during milk fermentation. Specifically, the tripeptide VPP was identified in one of the fermented dairy products by using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. This peptide had previously been described as one of the most potent ACE-inhibitory peptides *in vitro* and has been proved to exhibit antihypertensive effect peptide *in vivo*.

Additionally, the simulation of the gastrointestinal digestion of four commercial products, two fermented dairy products, and two infant formulas, has allowed the study of the ACE-inhibitory activity in these products after going through the digestive tract. It has been observed that the ACE-inhibitory activity remained or increased after such simulation. These results show that the active peptides formed during fermentation resisted digestive enzymatic action or new active fragments can be formed during gastrointestinal digestion.

In the fourth section, a preliminary study for developing fermented foods having ACE-inhibitory activity was carried out. With this aim, milk and a whey protein concentrate was fermented with different acid lactic bacteria strains and the effect of strain and the fermentation conditions on ACE-inhibitory activity of the fermented product was evaluated. The fermented milks with *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus helveticus* were those that presented higher ACE-inhibitory percentages. Although the results of this section are very preliminary, the fermentation strategy could be used in the development of new functional foods aimed to hypertension prevention and/or treatment.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACE:	Enzima convertidora de angiotensina
ADP:	Adenosin trifosfato
BCA:	Ácido bicinconínico
BSA:	Seroalbúmina
CECT:	Colección Española de Cultivos Tipo
CMP:	Caseinomacropéptido
CN:	Caseína
CSIC:	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Da:	Daltons
DTT:	DL-ditiotreitol
EC:	Electroforesis capilar
ECE:	Enzima convertidora de endotelina
EDTA:	Ácido etilendiaminotetracético
ESI-MS:	Espectrometría de masas con ionización por electrospray
FOSHU:	Food for Special Health Uses
FUFOSE:	Functional Food Science in Europe
HHL:	Hipuril-histidil-leucina
IEF:	Isoelectroenfoque
Ig:	Inmunoglobulina
ILSI:	International Life Science Institute
La:	Lactoalbúmina
Lf:	Lactoferrina
Lg:	Lactoglobulina
MHEC:	Metilhidroxietilcelulosa
MOPS:	Ácido 3-morfolinopropanosulfónico
MRS:	Man, Rogosa y Sharpe
MS-MS:	Espectrometría de masas en tandem
PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida
RP-HPLC:	Cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa
SDS:	Dodecil sulfato sódico
SIDA:	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

subsp:	Subespecie
TCA:	Ácido tricloroacético
TFA:	Ácido trifluoroacético
Tris:	Tris(hidroximetil)amino-metano
UA:	Unidades de absorbancia
ufc:	Unidades formadoras de colonias
UHT:	Ultra High Temperature
UV:	Ultravioleta

## **INDICE DE TABLAS Y FIGURAS**

<b>Tabla 1.</b>	Péptidos inhibidores de la ACE obtenidos por hidrólisis con enzimas digestivas y microbianas .....	50
<b>Tabla 2.</b>	Péptidos inhibidores de la ACE obtenidos por hidrólisis de las caseínas bovinas con la proteinasa de <i>Lactobacillus helveticus</i> CP790 .....	53
<b>Tabla 3.</b>	Péptidos inhibidores de la ACE obtenidos por procesos fermentativos a partir de $\alpha_{s1}$ -CN, $\beta$ -CN y $\kappa$ -CN .....	56
<b>Tabla 4.</b>	Péptidos inhibidores de la ACE obtenidos a partir de diferentes quesos	59
<b>Tabla 5.</b>	Péptidos lácteos inhibidores de la ACE obtenidos por síntesis química .	62
<b>Tabla 6.</b>	Péptidos inhibidores de la ACE identificados por bases de datos y derivados de la $\beta$ -CN y la $\beta$ -Lg bovina .....	64
<b>Tabla 7.</b>	Condiciones de hidrólisis de la $\beta$ -Lg ovina y caprina .....	77
<b>Tabla 8.</b>	Composición de los productos lácteos fermentados comerciales (LF) ...	85
<b>Tabla 9.</b>	Composición de las leches maternizadas comerciales (LM) .....	86
<b>Tabla 10.</b>	Composición de los quesos frescos (QF) y mousses de quesos frescos (M) comerciales .....	87
<b>Tabla 11.</b>	Cepa de las bacterias lácticas y condiciones de cultivo .....	93
<b>Tabla 12.</b>	Actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de los hidrolizados de la $\beta$ -Lg ovina y caprina por la tripsina, quimotripsina, proteinasa K y termolisina .....	116
<b>Tabla 13.</b>	Análisis de regresión de la actividad inhibitoria de la ACE respecto al contenido proteico en los hidrolizados digestivos y microbianos de la $\beta$ -Lg ovina y caprina a las 24 horas .....	123
<b>Tabla 14.</b>	IC <sub>50</sub> de los hidrolizados digestivos y microbianos de $\beta$ -Lg ovina y caprina a las 24 horas .....	124
<b>Tabla 15.</b>	Masa molecular, fragmento y secuencia de los péptidos del hidrolizado de la $\beta$ -Lg caprina por la termolisina a las 24 horas .....	127
<b>Tabla 16.</b>	Masa molecular, fragmento, secuencia, concentración peptídica, actividad inhibitoria de la ACE e IC <sub>50</sub> de los péptidos del hidrolizado de la $\beta$ -Lg caprina por la termolisina a las 24 horas .....	134



<b>Tabla 17.</b>	Masa molecular, fragmento y secuencia de los péptidos identificados (HPLC-ESI-MS) a partir del hidrolizado de la $\beta$ -Lg A bovina por la termolisina. Se indica el tiempo necesario para su liberación a cada una de las temperaturas de incubación .....	144
<b>Tabla 18.</b>	Masa molecular, fragmento y secuencia de los péptidos identificados (HPLC-ESI-MS) a partir del hidrolizado de la $\beta$ -Lg A bovina por la termolisina. Se indica el tiempo transcurrido para su hidrólisis en función de la temperatura de incubación .....	146
<b>Tabla 19.</b>	Actividad inhibitoria de la ACE, nitrógeno total, amínico y peptídico del extracto soluble en agua de los productos lácteos fermentados .....	151
<b>Tabla 20.</b>	Actividad inhibitoria de la ACE, nitrógeno total, amínico y peptídico del extracto soluble en agua de las leches maternizadas .....	158
<b>Tabla 21.</b>	Actividad inhibitoria de la ACE, nitrógeno total, amínico y peptídico del extracto soluble en agua de los quesos frescos y de las mousses de quesos frescos .....	163
<b>Tabla 22.</b>	Actividad inhibitoria de la ACE, nitrógeno total, amínico y peptídico de la fracción inferior a 3000 Da de los hidrolizados digestivos de los productos lácteos fermentados .....	171
<b>Tabla 23.</b>	Actividad inhibitoria de la ACE, nitrógeno total, amínico y peptídico de la fracción inferior a 3000 Da de los hidrolizados digestivos de las leches maternizadas .....	175
<b>Tabla 24.</b>	Actividad inhibitoria de la ACE, nitrógeno total, amínico y peptídico y relación entre la actividad y el nitrógeno peptídico del extracto soluble en agua y de las fracciones menores de 10000 y 3000 Da de un producto lácteo fermentado .....	178
<b>Tabla 25.</b>	Masa molecular, secuencia y fragmento de los péptidos de una fracción aislada a partir del suero de un producto lácteo fermentado .....	184

<b>Figura 1.</b>	Secuencias de aminoácidos de la $\beta$ -Lg B bovina, $\beta$ -Lg A y B ovina y $\beta$ -Lg caprina .....	33
<b>Figura 2.</b>	Sistemas renina-angiotensina y quinina-caliceína. Acción de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) .....	47
<b>Figura 3.</b>	Electroforegrama obtenido mediante IEF de la $\beta$ -Lg ovina y caprina ....	100
<b>Figura 4.</b>	Electroforegrama obtenido mediante EC de la $\beta$ -Lg ovina de suero ácido y de suero dulce .....	102
<b>Figura 5.</b>	Perfiles cromatográficos (RP-HPLC) de la $\beta$ -Lg caprina y de sus hidrolizados con termolisina a distintos tiempos .....	105
<b>Figura 6.</b>	Perfiles peptídicos (RP-HPLC) de los hidrolizados trípticos de la $\beta$ -Lg ovina y caprina a las 24 horas .....	107
<b>Figura 7.</b>	Perfiles peptídicos (RP-HPLC) de los hidrolizados por la proteinasa K de la $\beta$ -Lg ovina y caprina a las 24 horas .....	110
<b>Figura 8.</b>	Perfiles peptídicos (RP-HPLC) de los hidrolizados por la termolisina de la $\beta$ -Lg ovina y caprina a las 24 horas .....	112
<b>Figura 9.</b>	Relación entre el porcentaje de inhibición de la ACE y la concentración peptídica de di-peptidos sintéticos .....	114
<b>Figura 10.</b>	Evolución de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de incubación de la $\beta$ -Lg ovina y caprina con la tripsina .....	117
<b>Figura 11.</b>	Evolución de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de incubación de la $\beta$ -Lg ovina y caprina con la quimotripsina .....	118
<b>Figura 12.</b>	Evolución de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de incubación de la $\beta$ -Lg ovina y caprina con la proteinasa K .....	119
<b>Figura 13.</b>	Evolución de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de incubación de la $\beta$ -Lg ovina y caprina con la termolisina .....	121
<b>Figura 14.</b>	Espectro de masas del hidrolizado de la $\beta$ -Lg caprina por la termolisina a las 24 horas y cromatograma de iones totales de distintas fracciones ..	126
<b>Figura 15.</b>	Actividad inhibitoria de la ACE (%) de las fracciones del hidrolizado de la $\beta$ -Lg caprina por la termolisina .....	128
<b>Figura 16.</b>	Cromatograma (RP-HPLC) de la fracción 6 y cromatograma de iones totales de las subfracciones 6.1. y 6.2. del hidrolizado de la $\beta$ -Lg caprina por la termolisina a las 24 horas .....	130

<b>Figura 17.</b> Cromatogramas (RP-HPLC) y cromatograma de iones totales de las fracciones 7, 13, 14 y 15 del hidrolizado de la $\beta$ -Lg caprina por la termolisina a las 24 horas .....	132
<b>Figura 18.</b> Secuencia primaria de la $\beta$ -Lg caprina. Detalle de los péptidos bioactivos caracterizados en nuestro estudio .....	136
<b>Figura 19.</b> Cromatogramas (RP-HPLC) de los hidrolizados de $\beta$ -Lg A bovina por la termolisina a 37°C y a distintos tiempos .....	138
<b>Figura 20.</b> Cromatogramas (RP-HPLC) de los hidrolizados de $\beta$ -Lg A bovina por la termolisina durante 2 horas a distintas temperaturas .....	141
<b>Figura 21.</b> Espectro de masas (MS) del hidrolizado de $\beta$ -Lg A bovina por la termolisina durante 2 horas a 60°C. Cromatograma de iones totales de una fracción del hidrolizado .....	143
<b>Figura 22.</b> Espectro de masas (MS) del hidrolizado de $\beta$ -Lg A bovina por la termolisina durante 30 minutos a 37°C. Cromatograma de iones totales de una fracción del hidrolizado .....	145
<b>Figura 23.</b> Espectro de masas (MS) del hidrolizado de $\beta$ -Lg A bovina por la termolisina durante 2 horas a 60°C. Cromatograma de iones totales de una fracción del hidrolizado .....	147
<b>Figura 24.</b> Relación entre la actividad inhibitoria de la ACE y el nitrógeno peptídico del extracto soluble en agua de los productos lácteos fermentados .....	153
<b>Figura 25.</b> Concentración de $\beta$ -Lg en el extracto soluble en agua de los productos lácteos fermentados .....	155
<b>Figura 26.</b> Cromatogramas (RP-HPLC) de los extractos solubles en agua de distintos productos lácteos fermentados .....	157
<b>Figura 27.</b> Relación entre la actividad inhibitoria de la ACE y el nitrógeno peptídico del extracto soluble en agua de las leches maternizadas .....	159
<b>Figura 28.</b> Cromatogramas (RP-HPLC) de los extractos solubles en agua de distintas leches maternizadas .....	161
<b>Figura 29.</b> Porcentajes de inhibición de la ACE de las leches maternizadas y de las correspondientes fracciones séricas .....	162

<b>Figura 30.</b> Relación entre la actividad inhibitoria de la ACE y el nitrógeno peptídico del extracto soluble en agua de los quesos frescos y de las mousses de quesos frescos .....	165
<b>Figura 31.</b> Cromatogramas (RP-HPLC) de los extractos solubles en agua de un queso fresco y una mousse de queso fresco .....	166
<b>Figura 32.</b> Evolución de la actividad inhibitoria de la ACE con la hidrólisis digestiva de los productos lácteos fermentados .....	169
<b>Figura 33.</b> Evolución, durante la digestión gastrointestinal, de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al nitrógeno peptídico en la fracción menor de 3000 Da de los productos lácteos fermentados .....	172
<b>Figura 34.</b> Evolución de la actividad inhibitoria de la ACE con la hidrólisis digestiva de las leches maternizadas .....	174
<b>Figura 35.</b> Evolución, durante la digestión gastrointestinal, de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al nitrógeno peptídico en la fracción menor de 3000 Da de las leches maternizadas .....	176
<b>Figura 36.</b> Cromatograma (RP-HPLC preparativo) de la fracción sérica de un producto lácteo fermentado .....	181
<b>Figura 37.</b> Relación entre el porcentaje de inhibición de la ACE y el contenido de péptidos de las fracciones del suero de un producto lácteo fermentado ..	182
<b>Figura 38.</b> Espectro de masas de una fracción del suero de un producto lácteo fermentado. Cromatograma de iones totales de varias subfracciones .....	183
<b>Figura 39.</b> Absorbancia con respecto al tiempo de incubación de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> en medio MRS líquido .....	187
<b>Figura 40.</b> Microfotografías de microscopia óptica de cepas de <i>Lactobacillus casei</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	190
<b>Figura 41.</b> pH, log ufc/mL y actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de incubación de <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> y <i>Lb. casei</i> en leche UHT .....	192
<b>Figura 42.</b> pH, log ufc/mL y actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de incubación de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. johnsonii</i> y <i>St. thermophilus</i> en leche UHT .....	195

<b>Figura 43.</b> pH, log ufc/mL y actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de incubación de <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> y <i>Lb. casei</i> en concentrado de proteínas de suero .....	197
<b>Figura 44.</b> pH, log ufc/mL y actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de incubación de <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. johnsonii</i> y <i>St. thermophilus</i> en concentrado de proteínas de suero .....	199

## **OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO**

Recientemente, el interés, tanto de la comunidad científica como de la industria alimentaria se ha centrado en el estudio del papel de los componentes nutritivos y no nutritivos del alimento en la prevención de ciertas enfermedades crónicas, de carácter degenerativo, como las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, entre otras. Este interés ha conducido al nacimiento de los llamados “alimentos funcionales”, capaces de ejercer efectos beneficiosos sobre el organismo, adicionales al efecto meramente nutritivo.

El empleo de los péptidos bioactivos como ingredientes de los alimentos funcionales ha atraído la atención de los investigadores, debido a la variedad de propiedades biológicas atribuidas a dichos péptidos. Estos péptidos bioactivos, inactivos en el interior de la secuencia de la proteína precursora, pueden liberarse por hidrólisis enzimática *in vitro* o *in vivo* o por procesos fermentativos. Debido a la relación causa/efecto existente entre la hipertensión, junto a sus complicaciones cardíacas, cerebrales y renales, y la mortalidad en los países desarrollados, en los últimos años, los estudios se han centrado en la búsqueda de péptidos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y en el consecuente empleo de dichos péptidos como ingredientes de alimentos funcionales encaminados a la prevención y tratamiento de la hipertensión.

Las proteínas lácteas se han convertido en una de las fuentes principales de péptidos con actividad antihipertensiva. Los estudios llevados a cabo hasta la actualidad han permitido la obtención de péptidos derivados de las proteínas lácteas de origen bovino, especialmente procedentes de las caseínas, proteínas mayoritarias de la leche. Sin embargo, no se han estudiado en profundidad los péptidos con actividad inhibitoria de la ACE procedentes de las proteínas de origen ovino y caprino. En los países mediterráneos, el queso se elabora fundamentalmente con leche de oveja y de cabra, lo que supone un excedente de producción de suero de quesería de estas especies. Las proteínas constituyentes del suero de quesería pueden ser una fuente adicional de péptidos con actividad inhibitoria de la ACE *in vitro* y efecto antihipertensivo *in vivo*, por lo que la identificación de dichos péptidos permitiría el aprovechamiento de este subproducto de la industria alimentaria, incrementando simultáneamente su valor funcional.

Además, la aplicación de tratamientos térmicos simultáneamente con los procesos de hidrólisis enzimática, podría suponer la aparición de secuencias peptídicas con nuevas o más potentes actividades biológicas, ya que altas temperaturas pueden alterar la conformación de la proteína precursora, permitiendo a las enzimas el acceso a regiones inaccesibles en condiciones nativas y la consecuente liberación de nuevos péptidos.

Por lo tanto, el objetivo global de la tesis ha sido identificar y caracterizar los péptidos con capacidad inhibitoria de la ACE, procedentes de proteínas lácteas mediante procesos de hidrólisis enzimática y procesos fermentativos. Se seleccionaron las condiciones óptimas de ambos tipos de procesos, estudiando el efecto de los distintos factores que influyen en los mismos.

Para conseguir el objetivo propuesto, se llevó a cabo el siguiente plan de trabajo:

- Aislamiento y caracterización de péptidos inhibidores de la ACE procedentes de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina tras la hidrólisis con enzimas de origen digestivo y microbiano.
- Aislamiento y caracterización de péptidos derivados de la  $\beta$ -Lg bovina en condiciones desnaturalizantes.
- Estudio de la actividad inhibitoria de la ACE en distintos productos lácteos comerciales. Evaluación de dicha actividad inhibitoria tras los procesos de simulación de la digestión gastrointestinal. Aislamiento y caracterización de péptidos responsables de la actividad inhibitoria de la ACE de los productos lácteos comerciales.
- Estudio de la influencia de la cepa bacteriana y de las condiciones del proceso de fermentación en la actividad inhibitoria de la ACE, tanto en leche como en un concentrado de proteínas de suero fermentados en el laboratorio con distintas cepas de bacterias lácticas.



# **INTRODUCCIÓN**

## **1.1. COMPOSICIÓN PROTEICA DE LA LECHE**

La leche está compuesta principalmente por agua, carbohidratos, lípidos y proteínas, así como por otros constituyentes minoritarios como las enzimas, vitaminas y sales minerales. Las proteínas se encuentran en una proporción de 30-35 g/L, constituyendo la fracción más compleja de la leche. Existen dos tipos de proteínas lácteas, las caseínas, que representan el 80% y las proteínas de suero. Estos dos tipos de proteínas se separan por precipitación isoeléctrica, acidificando la leche cruda de vaca y de oveja a 20°C hasta pH 4,6 (Whitney, 1988).

La concentración proteica total, así como la concentración y la secuencia aminoacídica de cada una de las proteínas lácteas dependen de la especie. El porcentaje de homología entre las proteínas de vaca/oveja o de vaca/cabra es del 95% y asciende hasta el 98% entre las proteínas de cabra y oveja. Además, dentro de cada especie existen diferencias en función de factores genéticos, fisiológicos y nutricionales (Storry y col., 1983).

### **1.1.1. Proteínas de suero**

Como proteínas de suero o proteínas solubles se engloba un conjunto de proteínas que permanecen en la fase líquida tras la precipitación de las caseínas a pH 4,6 y 20°C (Whitney, 1988). Algunos péptidos de bajo peso molecular procedentes de la hidrólisis de las caseínas, al ser solubles al pH y la temperatura citados también se incluyen en este grupo de proteínas.

Las proteínas séricas mayoritarias son la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg),  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La), seroalbúmina (BSA) e inmunoglobulinas (Ig) (Fox y Flynn, 1994). La concentración de estas proteínas difiere de unas especies a otras, siendo mayor en la leche de oveja (Law, 1995) y similar en la leche de vaca y de cabra. Las proteínas minoritarias incluyen la lactoferrina (Lf) y distintas enzimas, como la plasmina y la lactoperoxidasa (Walstra y Jenness, 1984).

### 1.1.1.1. $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg)

Es la proteína mayoritaria en el suero de la leche de los rumiantes. Representa alrededor del 60% del total de las proteínas de suero de leche de vaca (Law y col., 1993), variando la concentración entre 2,3 y 4,9 g/L. En leche de cabra la concentración se encuentra entre 1,8 y 2,8 g/L y en leche de oveja varía esta cantidad entre 2,7 y 5,0 g/L (Storry y col., 1983). Sin embargo, esta proteína no está presente en la leche humana y de roedores.

La  $\beta$ -Lg bovina consiste en una cadena de 162 aminoácidos, de peso molecular aproximado de 18000 Da. Contiene cinco Cys, cuatro de las cuales están implicadas en la formación de puentes disulfuro (Cys<sub>66-160</sub> y Cys<sub>106-119</sub>) y una (Cys<sub>121</sub>) aparece como grupo tiol libre (Godovac-Zimmermann y Braunitzer, 1987). En la Figura 1 se muestra la secuencia primaria de la  $\beta$ -Lg bovina, ovina y caprina. La  $\beta$ -Lg bovina y ovina presentan cinco y cuatro variantes genéticas, respectivamente, siendo las variantes A y B las mayoritarias en ambas especies (Ng-Kwai-Hang y Grosclaude, 1992). Sin embargo, la  $\beta$ -Lg caprina presenta una única variante genética.

La estructura secundaria de esta proteína incluye una estructura en forma de  $\alpha$ -hélice en un 15%, que se estabiliza por la formación de enlaces hidrofóbicos entre los residuos no polares y las Lys, una estructura de lámina  $\beta$  en un 50% y una forma reversa en un 15-20% (Creamer y col., 1983). La  $\beta$ -Lg presenta estructura globular, con una distribución más o menos uniforme de las secuencias polares y no polares. Debido a esta estructura, se producen interacciones intramoleculares que provocan la formación de puentes disulfuro, quedando las zonas hidrofóbicas hacia el interior y el exterior aparece con un marcado carácter hidrófilo. A un valor de pH entre 5 y 7, la  $\beta$ -Lg se encuentra como dímero, formado por la unión no covalente de dos monómeros (Pérez y Calvo, 1995). Si el pH es inferior a 3,5 o superior a 7,5, se disocia en monómeros, debido a repulsiones electrostáticas entre sus unidades (Townsend y col., 1960), mientras que a pH entre 3,5 y 5,2 la  $\beta$ -Lg forma reversiblemente tetrámeros y octámeros (Wong y col., 1996).

<b>β-LG BOVINA B</b>	<b>L</b> IVTQTMKGLDIQKVAGTW <b>Y</b> <sup>20</sup> SLAMAASDISLLDAQSAPLR <sup>40</sup> VYVEELKPTPEG <b>D</b> LEILLQK <sup>60</sup>
<b>β-LG OVINA A</b>	<b>I</b> IVTQTMKGLDIQKVAGTW <b>Y</b> <sup>20</sup> SLAMAASDISLLDAQSAPLR <sup>40</sup> VYVEELKPTPEG <b>N</b> LEILLQK <sup>60</sup>
<b>β-LG OVINA B</b>	<b>I</b> IVTQTMKGLDIQKVAGTW <b>H</b> <sup>20</sup> SLAMAASDISLLDAQSAPLR <sup>40</sup> VYVEELKPTPEG <b>N</b> LEILLQK <sup>60</sup>
<b>β-LG CAPRINA</b>	<b>I</b> IVTQTMKGLDIQKVAGTW <b>Y</b> <sup>20</sup> SLAMAASDISLLDAQSAPLR <sup>40</sup> VYVEELKPTPEG <b>N</b> LEILLQK <sup>60</sup>
<b>β-LG BOVINA B</b>	<b>(G)</b> WENDECAQKKIIAEKTKIPA <sup>80</sup> VFKIDALNENKVLVLDTDYK <sup>100</sup> KYLLFCMENSAEPEQSL <b>V</b> <b>(A)</b> CQ <sup>120</sup>
<b>β-LG OVINA A</b>	WENDECAQKKIIAEKTKIPA <sup>80</sup> VFKIDALNENKVLVLDTDYK <sup>100</sup> KYLLFCMENSAEPEQSL <b>A</b> CQ <sup>120</sup>
<b>β-LG OVINA B</b>	WENDECAQKKIIAEKTKIPA <sup>80</sup> VFKIDALNENKVLVLDTDYK <sup>100</sup> KYLLFCMENSAEPEQSL <b>A</b> CQ <sup>120</sup>
<b>β-LG CAPRINA</b>	WENDECAQKKIIAEKTKIPA <sup>80</sup> VFKIDALNENKVLVLDTDYK <sup>100</sup> KYLLFCMENSAEPEQSL <b>A</b> CQ <sup>120</sup>
<b>β-LG BOVINA B</b>	CLVRTPEVD <b>D</b> EALEKFDKAL <sup>140</sup> KALPMHIRL <b>S</b> FNPTQLE <b>E</b> QC <sup>160</sup> H <b>I</b> <sup>162</sup>
<b>β-LG OVINA A</b>	CLVRTPEVD <b>N</b> EALEKFDKAL <sup>140</sup> KALPMHIRL <b>A</b> FNPTQLE <b>G</b> QC <sup>160</sup> H <b>V</b> <sup>162</sup>
<b>β-LG OVINA B</b>	CLVRTPEVD <b>N</b> EALEKFDKAL <sup>140</sup> KALPMHIRL <b>A</b> FNPTQLE <b>G</b> QC <sup>160</sup> H <b>V</b> <sup>162</sup>
<b>β-LG CAPRINA</b>	CLVRTPEVD <b>K</b> EALEKFDKAL <sup>140</sup> KALPMHIRL <b>A</b> FNPTQLE <b>G</b> QC <sup>160</sup> H <b>V</b> <sup>162</sup>

**Figura 1.** Secuencias de aminoácidos de la β-Lg B bovina, β-Lg A y B ovina y β-Lg caprina. Las diferencias entre las variantes A y B de la β-Lg bovina están marcadas en color azul. En rojo se indican los aminoácidos distintos en la proteína de las tres especies

La ausencia de fosfato, el bajo contenido en Pro y la presencia de Cys, cistina y Met, hacen que la  $\beta$ -Lg sea poco estable frente a agentes desnaturizantes, como el calor, los álcalis, los compuestos orgánicos y los metales pesados. La acción de la temperatura sobre esta proteína provoca la disociación del dímero a monómero, la posterior desnaturización del monómero con la exposición de los grupos sulfhidrilo y la formación de agregados (Caligant y col., 1991). Este proceso será o no reversible en función de la intensidad y la duración del tratamiento (Burton, 1984). Además, la desnaturización provoca la exposición de grupos activos, ocultos en la estructura nativa, que pueden reaccionar entre sí o con grupos activos de otros compuestos (Sawyer, 1968; Chaplin y Lyster, 1986).

#### **1.1.1.2. $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La)**

La  $\alpha$ -La representa el 25% de las proteínas del suero. En leche de vaca, la concentración varía entre 0,8 y 1,2 g/L, entre 0,6 y 1,1 g/L en leche de cabra y entre 1,2 y 2,6 en leche de oveja (Storry y col., 1983).

La  $\alpha$ -La bovina es una proteína globular de peso molecular aproximado de 14400 Da. Está constituida por 123 aminoácidos y cuatro enlaces disulfuro, sin ningún grupo tiol libre. Presenta tres variantes genéticas A, B y C, siendo la variante B la más común (Bell y col., 1981; Eigel y col., 1984).

La  $\alpha$ -La presenta una configuración estable a valores de pH entre 5,4 y 9. Presenta mayor resistencia al calor que la  $\beta$ -Lg, debida en parte a que la desnaturización es reversible si la temperatura es inferior a los 75°C (Law y col., 1994). Se ha comprobado que liga fuertemente dos átomos de calcio y que la eliminación de este catión del medio provoca un cambio conformacional de la proteína (Hiraoka y col., 1980; Permyakov y col., 1981; Murakami y col., 1982) y el incremento de la sensibilidad a agentes desnaturizantes, como el calor o los productos químicos.

### **1.1.1.3. Seroalbúmina (BSA)**

La BSA se encuentra en el suero en una concentración aproximada de 0,3 g/L. Consiste en una cadena de 582 aminoácidos, de peso molecular aproximado de 66200 Da (Spencer y King, 1971; Reed y col., 1980). Contiene 17 puentes disulfuro y un grupo tiol libre (Riera y col., 1996). Se han encontrado estructuras como monómero y como dímero, pero polimerizaciones de mayor grado no parecen comunes (Janatova y col., 1968).

Es una proteína de baja estabilidad térmica, por lo que se desnaturaliza fácilmente. Tiene tendencia a unirse a otras moléculas, principalmente a ácidos grasos (Peters, 1995), lo que le sirve de protección frente al ataque enzimático y a la desnaturalización térmica (Riera y col., 1996).

### **1.1.1.4. Inmunoglobulinas (Ig)**

Hay cinco clases o isotipos de inmunoglobulinas, Ig G, Ig M, Ig A, Ig D e Ig E, de las cuales la Ig G es la mayoritaria, representando el 80% del total de las Ig presentes en la leche. La concentración de esta Ig es de 0,6 g/L en el suero y diez veces mayor en el calostro. Su actividad como anticuerpos favorece la transferencia de inmunidad pasiva al neonato (Larson y col., 1980). Todas las Ig presentan una estructura similar, compuesta por cuatro subunidades de peso molecular próximo a los 160000 Da y unidas por puentes disulfuro (Galley, 1973; Butler, 1974).

### **1.1.1.5. Lactoferrina (Lf)**

Es una glicoproteína presente en la mayoría de los fluidos biológicos de los mamíferos, incluyendo la leche, la saliva y las secreciones mucosas. Contiene 689 aminoácidos, con un peso molecular próximo a los 80000 Da. La molécula presenta 16 puentes disulfuro que forman dos lóbulos homólogos (Ribadeau-Dumas, 1993).

Fija el hierro, por lo que puede desempeñar un importante papel en el control de la absorción de este mineral y en la selección de la flora intestinal del neonato (Sánchez y col., 1992). Además, actúa en el sistema de defensa del organismo frente a las infecciones

bacterianas, debido a la formación de un complejo de la enzima con el tiocianato y el peróxido de hidrógeno (Wolfson y Summer, 1993).

### 1.1.2. Caseínas

Como caseínas se incluye un grupo de proteínas que permanecen insolubles a pH 4,6 y 20°C (Whitney, 1988). Representan el 80% de las proteínas en leche de vaca y oveja y el 72% en leche de cabra.

Bajo la denominación de caseínas se incluyen cuatro tipos de cadenas polipeptídicas,  $\alpha_{s1}$ -caseína ( $\alpha_{s1}$ -CN),  $\alpha_{s2}$ -caseína ( $\alpha_{s2}$ -CN),  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -CN) y  $\kappa$ -caseína ( $\kappa$ -CN). Las secuencias de sus estructuras primarias son complejas y muy diferentes a las de otras proteínas, debido al alto contenido de Pro y a las regiones ácidas que incluyen los residuos de fosfoserina (Creamer y MacGibbon, 1996). La conformación secundaria de las caseínas está poco organizada ( $\alpha$ -hélice y lámina  $\beta$ -plegada de longitudes cortas), similar a la estructura de las proteínas globulares desnaturalizadas (Walstra y Jenness, 1987). Debido a su diferente distribución de las cargas y a su hidrofobicidad, las caseínas se unen entre sí formando unas unidades o agregados coloidales denominados micelas, compuestos por un 92% de proteína y un 8% de sales inorgánicas, principalmente fosfato cálcico.

Las distintas variantes genéticas conocidas de la  $\alpha_{s1}$ -CN se diferencian en el grado de fosforilación, comprendido entre 8 y 9 y en la sustitución de hasta 7 aminoácidos de los 199 que componen su estructura primaria. Se pueden distinguir tres zonas claramente hidrofóbicas, f(1-44), f(90-113) y f(132-199) y un dominio de alta polaridad situado en el segmento f(41-80), en el que se encuentra la mayor parte de la carga de la proteína (Swaisgood, 1992; Wong y col., 1996).

La  $\alpha_{s2}$ -CN, compuesta por 207 aminoácidos, es la proteína más hidrofílica del grupo de las caseínas. Puede tener entre 10 y 13 grupos fosfato distribuidos a lo largo de su cadena. Es una proteína caracterizada por tener diferentes dominios con altas cargas netas, lo que le hace fuertemente sensible a la acción del calcio y de otros cationes.

La  $\beta$ -CN, compuesta por 209 aminoácidos, tiene entre 4 y 5 residuos de fosfoserina situados en el extremo N-terminal y presenta un fuerte carácter hidrofóbico en la mitad del extremo C-terminal f(136-209). Esta separación de la molécula en dos dominios de diferente hidrofobicidad hacen que esta proteína sea altamente anfipática (Swaisgood, 1992).

La  $\kappa$ -CN es la proteína más diferente dentro del grupo de las caseínas, presentando Cys en su estructura primaria (Creamer y MacGibbon, 1996). Tiene 169 aminoácidos y hasta 5 cadenas glicosídicas unidas a los residuos de Tre o Ser. Se dividen dos dominios claramente diferenciados, el segmento N-terminal hidrofóbico y con carga neta positiva y el extremo C-terminal, de alto carácter hidrofílico. En su estado nativo se encuentra como polímero debido a la formación de puentes disulfuro entre los grupos sulfhidrilo.

Durante la elaboración del queso, la acción hidrolítica de las enzimas presentes en el cuajo sobre el enlace Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> de la  $\kappa$ -CN, localizada en la superficie de las micelas, da lugar a la para- $\kappa$ -CN, fragmento f(1-105), que queda retenida en la cuajada con el resto de las caseínas y el caseinomacropéptido (CMP), fragmento f(106-169), que permanece en el suero. La ruptura de la  $\kappa$ -CN provoca la desestabilización de las micelas y la consecuente coagulación de la leche.



## 1.2. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS PÉPTIDOS LÁCTEOS

Además del valor nutricional, determinado por la composición y adecuada digestibilidad de los aminoácidos constituyentes (Schlimme y Meisel, 1995), las proteínas lácteas poseen distintas propiedades biológicas. En estudios recientes se ha descrito el papel fisiológico de las proteínas lácteas como fuente de **“péptidos bioactivos o funcionales”**. Estos péptidos se definen como secuencias de aminoácidos inactivas en el interior de la proteína precursora, pero que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática. Generalmente, son péptidos de pequeño tamaño, de 3 a 20 aminoácidos, liberados durante el procesado industrial de los alimentos o bien, durante la digestión gastrointestinal (Meisel y col., 1989).

Las actividades descritas hasta la actualidad para estos péptidos son diversas, e incluyen la actividad opiácea, inmunomodulante, antimicrobiana, antitrombótica, quelante de minerales y antihipertensiva, entre otras.

### 1.2.1. Actividad opiácea

El estudio de la actividad opiácea en un hidrolizado de proteínas lácteas dio lugar al nacimiento del concepto de “exorfina”, o péptido opiáceo de origen dietético, en contraposición al de “endorfina” o péptido endógeno (Fazel, 1998).

Como agonistas opiáceos se incluyen los derivados de las caseínas, como las  $\beta$ -casomorfina, fragmentos incluidos en la zona f(60-70) de la  $\beta$ -CN y ligandos de los receptores  $\mu$  (Teschemacher y Brantl, 1994) y las exorfinas, fragmentos procedentes de la  $\alpha_{s1}$ -CN (Loukas y col., 1983) y ligandos de los receptores  $\delta$ . La  $\alpha$ -lactorfina, que corresponde al fragmento f(50-53), la  $\beta$ -lactorfina, fragmento f(102-105) y la serorfina, fragmento f(399-404), son agonistas de los receptores opiáceos  $\mu$ , derivados de la  $\alpha$ -La, la  $\beta$ -Lg y la BSA, respectivamente (Chiba y Yoshikawa, 1986; Antila y col., 1991; Tani y col., 1994).

La característica estructural común entre los agonistas opiáceos endógenos y exógenos es la presencia de Tyr en el extremo amino terminal (excepto los derivados de la

$\alpha$ -CN). La carga negativa localizada en el grupo fenólico de la Tyr se ha descrito como esencial para la actividad opiácea, ya que la eliminación de este aminoácido provoca la pérdida de actividad del péptido (Chang y col., 1981). La presencia de otro aminoácido aromático, Phe o Tyr en la tercera o cuarta posición favorece la fijación del péptido al receptor opiáceo (Meisel, 1998). Además, la Pro en la segunda posición es crucial para la actividad biológica ya que mantiene la orientación de las cadenas de los aminoácidos Tyr y Phe (Mierke y col., 1990).

Tras ser ingeridos en el alimento o tras liberarse durante la digestión gastrointestinal, las  $\beta$ -casomorfina pueden ejercer los efectos a nivel local, que sólo se han descrito en animales adultos. Así, se ha estudiado la reducción del grado de vaciamiento gástrico y de la motilidad intestinal en ratas (Daniel y col., 1993) y el efecto antisecretorio en el íleon de conejo (Tomé y col., 1987). Además, se ha observado el efecto modulador de los niveles de insulina y somatostatina en perros (Schusdziarra y col., 1983a y b) y la regulación del transporte intestinal de aminoácidos (Brandsch y col., 1994). En humanos adultos se han detectado fragmentos opiáceos en el contenido intestinal tras la ingestión de leche de vaca (Svedberg y col., 1985), no detectándose en el suero sanguíneo. La confirmación en el hombre de los efectos detectados en los animales de experimentación abriría un nuevo campo de aplicación de estos péptidos opiáceos en la prevención y el tratamiento de desórdenes intestinales.

Por el contrario y debido a la inmadurez y consecuente mayor permeabilidad de la barrera intestinal de los neonatos a los péptidos y proteínas, los fragmentos opiáceos se absorben y alcanzan la circulación sistémica, actuando sobre los receptores del sistema nervioso central. Se han encontrado  $\beta$ -casomorfina en el plasma de terneros recién nacidos (Umbach y col., 1985). Las  $\beta$ -casomorfina, administradas en animales de experimentación por vía intravenosa producen sedación, analgesia y modulación del comportamiento social (Teschmacher, 1987; Paroli, 1988). Actualmente, se buscan secuencias derivadas de las caseínas con alta potencia analgésica, escasos efectos colaterales y adecuadas características farmacocinéticas para su aplicación en humanos.

Los péptidos antagonistas opiáceos suprimen la actividad agonista de las encefalinas, produciendo el mismo efecto que la naloxona (Fiat y col., 1993). Este grupo

de péptidos incluye las casoxinas, procedentes de la  $\kappa$ -CN y de la  $\alpha_{s1}$ -CN (Chiba y col., 1989; Yoshikawa y Chiba, 1990), ligandos de los receptores  $\mu$  con baja actividad comparada con la de la naloxona y las lactoferroxinas, derivados de la lactoferrina, que actúan como ligandos de los receptores  $\mu$  con moderada actividad (Yoshikawa y col., 1988).

### 1.2.2. Actividad antitrombótica

Secuencias peptídicas de la  $\kappa$ -CN, denominadas casoplatelinas son similares a la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno (Caen y col., 1992). Se ha comprobado *in vitro* que los péptidos derivados del extremo carboxilo terminal de la  $\kappa$ -CN bovina y fundamentalmente el fragmento f(106-116) son inhibidores de la agregación plaquetaria y de la unión de la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno humano al receptor específico de la membrana de las plaquetas (Jollès y col., 1986). La característica estructural similar entre la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno y las casoplatelinas, responsable de la competencia en el proceso de agregación de las plaquetas, es la homología en la secuencia de los aminoácidos Ile, Lys y Asp en las posiciones 108, 112 y 115, respectivamente (Fiat y col., 1989).

La actividad antitrombótica ejercida por el fragmento Lys-Arg-Asp-Ser, derivado de la lactoferrina, se debe a otro mecanismo de acción, ya que inhibe, de manera dosis-dependiente, la agregación plaquetaria inducida por ADP, debido a la homología con el fragmento f(572-575) de la cadena  $\alpha$  del fibrinógeno (Mazoyer y col., 1990). Se ha comprobado *in vivo* que este fragmento inhibe la formación de trombos en la arteria coronaria de perros (Shebuski y col., 1989) y prolonga el tiempo de sangrado en la arteria mesentérica del hámster (Cook y col., 1988). Además, se ha descrito el efecto antitrombótico de este péptido sobre la trombosis inducida por láser en rata y cerdo (Drouet y col., 1990).

Se han encontrado secuencias peptídicas en el plasma de recién nacidos alimentados con leche materna o con fórmulas infantiles elaboradas con leche de vaca, en concentración suficiente para ejercer el efecto antitrombótico *in vivo*, lo que demuestra su liberación a partir de las proteínas lácteas durante el proceso de digestión gastrointestinal

(Chabance y col., 1995). Estudios más recientes han demostrado la presencia de péptidos antitrombóticos en el estómago, duodeno y posteriormente en la sangre de adultos que habían ingerido leche o yogur (Chabance y col., 1998), lo que demuestra la capacidad de las bacterias lácticas de hidrolizar las proteínas lácteas y formar péptidos bioactivos durante el proceso de fermentación, así como la capacidad del tracto gastrointestinal de absorber cadenas peptídicas.

### 1.2.3. Actividad inmunomodulante

Los péptidos responsables de esta actividad son fragmentos derivados de la  $\alpha_{s1}$ -CN (Meisel y col., 1989), de la  $\beta$ -CN (Parker y col., 1984), de la  $\kappa$ -CN y de la  $\alpha$ -La (Kayser y Meisel, 1996).

El mecanismo de acción de estos péptidos no es conocido, aunque la hipótesis más aceptada describe la unión a los receptores opiáceos situados en la membrana de los linfocitos, lo que influye en su capacidad inmunoreactiva. Se ha identificado el aminoácido Arg de los extremos amino o carboxilo terminal como la zona reconocida por los receptores específicos de la membrana de los linfocitos y los macrófagos (Pagelow y Werner, 1986).

Se ha visto que el péptido Tyr-Gly, que corresponde a los fragmentos f(18-19) y f(50-51) de la  $\alpha$ -La y al fragmento f(38-39) de la  $\kappa$ -CN y el péptido Tyr-Gly-Gly, que corresponde al fragmento f(18-20) de la  $\alpha$ -La, modulan la producción de linfoquinas *in vitro* (Kayser y Meisel, 1996), por lo que se están empleando en la inmunoterapia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (SIDA), ya que reducen notablemente el progreso hacia la fase clínicamente relevante de la enfermedad (Hadden, 1991). La isracidina, fragmento f(1-23) de la  $\alpha_{s1}$ -CN, permite el desarrollo de inmunidad a largo plazo frente a la reinfección por *Staphylococcus aureus* (Fazel, 1998). Además, las  $\beta$ -casomorfina y las exorfinas pueden actuar como inmunomodulantes debido a su afinidad por los receptores opiáceos presentes en las células T y en los leucocitos fagocíticos humanos (Migliore-Samour y col., 1989).

Los efectos de estos péptidos se han comprobado tras la administración intravenosa de los mismos, pero no existen en la actualidad estudios concluyentes sobre los efectos inmunomodulantes ejercidos tras su ingestión.

#### 1.2.4. Actividad antimicrobiana

La inhibición *in vitro* del crecimiento de cepas patógenas tiene lugar por la acción de fragmentos de las caseínas y de la lactoferrina. El efecto antimicrobiano de los péptidos derivados de las proteínas lácteas parece estar relacionado con la carga neta positiva de estos péptidos. Un gran porcentaje de los aminoácidos constituyentes son básicos y entre ellos forman un bucle en forma de  $\alpha$ -hélice en el extremo carboxilo terminal (Kang y col., 1996), que provoca la formación de canales iónicos en la membrana de los microorganismos (Agawa y col., 1991), alterando su permeabilidad y provocando la muerte celular (Bellamy y col., 1992).

El fragmento f(1-23) de la  $\alpha_{s1}$ -CN o isracidina, obtenido tras la hidrólisis por la quimosina, ejerce *in vivo* actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, a concentraciones comparables con la de antibióticos conocidos (Lahov y Regelson, 1996). Además, se han descrito con actividad antimicrobiana distintos fragmentos derivados de la  $\alpha_{s2}$ -CN, como la casocidina-I o fragmento f(165-203), que inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus carnosus* (Zucht y col., 1995). Las secuencias peptídicas f(164-179) y f(183-207), aisladas a partir de un hidrolizado de la  $\alpha_{s2}$ -CN con pepsina, provocan efectos antibacterianos frente a *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* (Recio y Visser, 1999a). Los fragmentos derivados de la  $\beta$ -CN humana ejercen efectos protectores frente a *Klebsiella pneumoniae* en ratón (Migliore-Samour y col., 1989). La lactoferricina, fragmento f(17-41), aislada de un hidrolizado con pepsina de la lactoferrina, presenta propiedades bacterianas *in vitro* frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos, incluidos *Bacillus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Streptococcus* y levaduras, como *Candida* (Bellamy y col., 1993; Recio y Visser, 1999b). El menor tamaño de este péptido con respecto al de la lactoferrina favorece el acceso a las zonas de acción de la superficie microbiana.

Los efectos *in vivo* de estos péptidos se han demostrado tras su administración por vía intravenosa. Sin embargo, no existen estudios de la influencia del proceso de digestión gastrointestinal sobre la actividad antimicrobiana de estos péptidos.

### **1.2.5. Actividad quelante de metales**

Los caseinofosfopéptidos son fragmentos derivados de la  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN y  $\beta$ -CN. La mayoría de estos péptidos contienen una secuencia con tres grupos de fosfoserina seguida de dos glutámicos. Las cadenas laterales negativas, en particular las de los grupos fosfato son las responsables de la unión de los minerales, especialmente del calcio (Sato y col., 1986). Además, las secuencias próximas a los grupos fosforilados determinan las diferencias en la actividad quelante del calcio de los distintos caseinofosfopéptidos (Schlimme y Meisel, 1995).

Estos péptidos ejercen efectos en la absorción del calcio y de otros elementos traza en el intestino, además de inhibir la caries mediante la recalcificación dental (Reynolds, 1987). Estos péptidos podrían emplearse como suplementos dietéticos y preparaciones farmacéuticas en el tratamiento de alteraciones dentales o para mejorar la mala absorción mineral (Brule y col., 1982).

### **1.2.6. Actividad antihipertensiva**

La hipertensión arterial es un proceso multifactorial, por lo que los péptidos con actividad antihipertensiva pueden actuar de formas muy diversas, siendo la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) el mecanismo de acción más estudiado. Dentro del reino animal, la actividad inhibitoria de la ACE se ha determinado en hidrolizados de gelatina bovina (Kim y col., 2001), de músculo de sardina (Matsufuji y col., 1994; Osajima y col., 1994), de bonito (Matsumura y col., 1993) o de atún (Kohama y col., 1988 y 1991) y en hidrolizados de músculo de gallina (Fujita y col., 2000). A partir de proteínas aisladas y purificadas, como la  $\alpha$ - y  $\gamma$ -zeína, se ha determinado la actividad inhibitoria de la ACE mediante procesos de síntesis (Maruyama y col., 1989a) y procesos hidrolíticos (Miyoshi y col., 1991; Yano y col., 1996). Pero dentro del reino animal, las proteínas más estudiadas como fuente de péptidos inhibidores de la ACE son las proteínas

lácteas, principalmente caseínas, tanto bovinas (Maruyama y Suzuki, 1982; Maruyama y col., 1987a) como humanas (Kohmura y col., 1989). Recientemente, se ha iniciado el estudio de las proteínas de suero como fuente de péptidos con actividad inhibitoria de la ACE (Mullally y col., 1997a y b; Pihlanto-Leppälä y col., 2000). Posteriormente se detallará este mecanismo de acción y se describirán los péptidos lácteos descritos hasta la actualidad con esta actividad (apartado 1.3.).

Otra de las enzimas involucradas en la regulación de la presión arterial es la enzima convertidora de endotelina (ECE). Cataliza la formación de endotelina-1 a partir de su precursor (Yanagisawa y col., 1988). La endotelina-1 es un potente vasoconstrictor, lo que favorece el incremento de la presión arterial. Por lo tanto, la inhibición de la ECE produce un efecto antihipertensivo. Sólo se han descrito péptidos inhibidores de esta enzima a partir de un hidrolizado digestivo del bonito (Okitsu y col., 1995), pero el alto contenido y variedad de proteínas presentes en la leche podría abrir un nuevo campo de estudio encaminado a la identificación de péptidos lácteos con esta actividad.

La acción de péptidos, como la  $\alpha$ -lactorfina, fragmento f(50-53) de la  $\alpha$ -La, sobre los receptores opiáceos, provocan el descenso de la presión arterial tras la administración por vía subcutánea (Nurminen y col., 2000).

#### **1.2.7. Otras actividades biológicas**

En estudios recientes se ha descrito la actividad antioxidante ejercida por la leche humana (VanderJagt y col., 2001). Además, mediante ensayos *in vitro* se ha comprobado esta actividad tanto en las caseínas, capaces de quelar el hierro e inhibir la peroxidación lipídica (Cervato y col., 1999) como en las proteínas de suero (Tong y col., 2000). Sin embargo, son necesarios nuevos estudios que confirmen la acción antioxidante de las proteínas lácteas en animales de experimentación y en humanos (Gill y col., 1996). También se han identificado fragmentos trípticos de la  $\beta$ -CN humana con actividad estimulante de la síntesis del ADN (Azuma y col., 1989).

La acción estabilizadora del sistema inmunitario y moduladora del intercambio de proteínas y de glucógeno ejercida por el péptido glutamina, así como las funciones

inhibitoria del depósito de grasa y alterante del metabolismo ejercida por el péptido FM han sido descritas por Steijns (1996).

Otras actividades biológicas de interés en la aplicación dietética y farmacéutica incluyen la inhibición de la secreción ácida de gastrina y de la motilidad gastrointestinal (Fiat y col., 1993), así como la inducción de la producción de colecistoquinina en ratas, hormona relacionada con la saciedad, ejercida por el CMP (Beucher y col., 1994). Estudios preliminares han demostrado este mismo efecto en el hombre (Corring y col., 1997).

La atriopentina es un péptido presente de forma natural en la leche que actúa como un fuerte diurético, natriurético y vasorelajante, además de jugar un papel importante en la adaptación del neonato a la vida extrauterina (Jezova y col., 1996).

Estudios más recientes se centran en la búsqueda de péptidos con actividad antitumoral, anticancerígena y antivírica, fundamentalmente frente al virus del SIDA (Smacchi y Gobbetti, 2000).

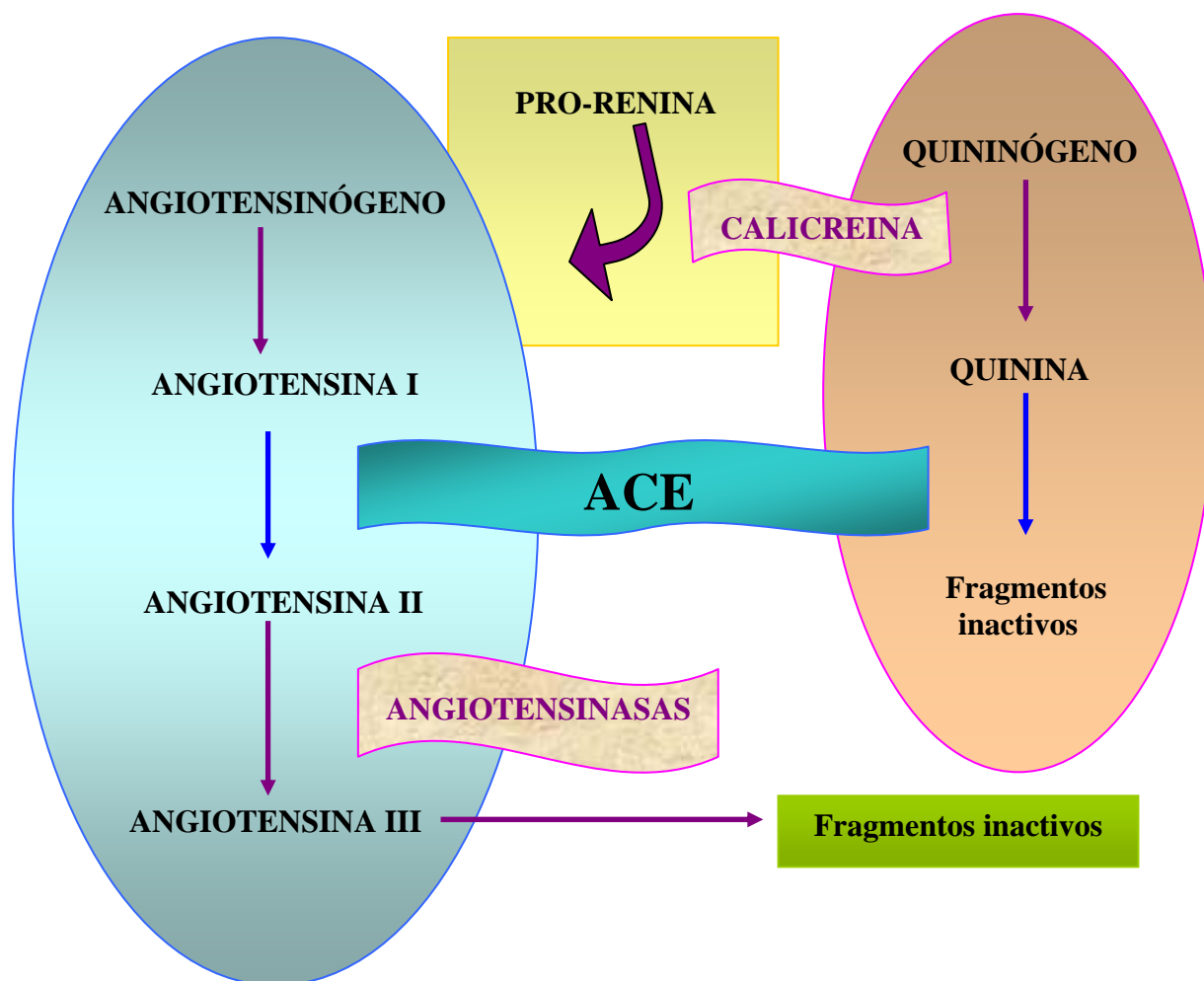


### **1.3. PÉPTIDOS LÁCTEOS CON ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ACE)**

#### **1.3.1. Actividad de la ACE. Relación estructura/actividad de los péptidos inhibidores de la ACE**

La ACE (EC 3.4.15.1) actúa en el sistema renina-angiotensina, hidrolizando la angiotensina-I, decapeptido inactivo, de secuencia DNVYIHPFHL, producido por la acción de la renina. La hidrólisis conduce a la liberación de la angiotensina-II y el dipéptido C-terminal Hys-Leu (Skeggs y col., 1956). La angiotensina-II es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora. Su acción provoca la contracción rápida de las arteriolas, y por tanto, el incremento de la presión arterial. Además, estimula la secreción de aldosterona por las glándulas suprarrenales, hormona que induce la retención de sodio y agua y la excreción de potasio. La acumulación de agua provoca el incremento del volumen extracelular (Tirelli y col., 1997), el consecuente aumento de la presión arterial y la neutralización de la producción de renina. La ACE actúa simultáneamente en el sistema quinina-caliceína, catalizando la degradación de las bradiquininas (Ërdos, 1975; Soffer, 1976), compuestos de potente acción vasodilatadora. Esta acción favorece el incremento de la presión arterial (Figura 2).

Se ha demostrado que la inhibición de la ACE provoca el descenso de la presión arterial en el hombre y en animales (Laffan y col., 1978). Se han identificado varios péptidos endógenos que actúan como inhibidores y sustratos competitivos de la ACE, como las encefalinas, las bradiquininas y la sustancia P. Como primeros inhibidores exógenos se estudiaron los extractos del veneno de la serpiente *Bothrops jararaca*. Estos extractos presentan un doble efecto. Potencian la actividad de la bradiquinina (Ferreira, 1965) e inhiben la ACE, tanto *in vitro* (Bakhle, 1968) como *in vivo* (Ng-Kwai-Hang y Vane, 1970). A partir de estos extractos se han aislado distintos péptidos (Ferreira y col., 1970; Ondetti y col., 1971). Actualmente, un derivado sintético, el Captopril (D-3-mercaptopropanoil-1-prolina;  $IC_{50} = 0,006 \mu M$ ), obtenido tras el estudio del modelo hipotético del sitio activo de la enzima, es el fármaco más empleado en el control de la hipertensión (Unger y col., 1981; Wyvratt y Patchett, 1985).



**Figura 2.** *Sistemas renina-angiotensina y quinina-callicreína. Acción de la enzima convertidora de angiotensina (ACE)*

La unión de los péptidos a la ACE está influida por la secuencia tripeptídica C-terminal de los mismos, que puede interactuar con tres regiones del centro activo de la ACE (Ondetti y Cushman, 1982). Así, los aminoácidos de carácter hidrofóbico, como Trp, Tyr, Phe o Pro favorecen la unión a estas zonas. El péptido con secuencia C-terminal Phe-Ala-Pro, análogo al encontrado en el inhibidor presente en el extracto del veneno de serpiente es uno de los más favorables para unirse al centro catalítico. La carga positiva del grupo guanidino o del grupo  $\epsilon$ -amino de la Arg o Lys, respectivamente, contribuyen a la potencia inhibitoria (Cheung y col., 1980). La presencia de aminoácidos dicarboxílicos en la secuencia peptídica o de Pro como penúltimo aminoácido disminuye o anula la actividad inhibitoria de la ACE (Erdös, 1976; Cushman y col., 1977). El extremo N-terminal

también influye en la actividad, y así, la presencia de Val o de Ile en esta posición incrementa la actividad inhibitoria de la ACE en el péptido.

### **1.3.2. Péptidos lácteos inhibidores de la ACE obtenidos mediante hidrólisis enzimática**

Para conseguir la liberación de péptidos bioactivos a partir de las proteínas lácteas, se ha llevado a cabo su hidrólisis empleando gran número de enzimas, de origen animal, como la pepsina, tripsina y quimotripsina, de origen vegetal, como la papaína y la bromelaína y de origen microbiano, como la proteinasa K o la termolisina. Se han optimizado las condiciones de temperatura, presión, pH, estructura química del sustrato,... etc., con el objetivo de modificar la resistencia de las proteínas a la enzima, inducir nuevos sitios de ruptura, proteger otras zonas y obtener nuevas fracciones bioactivas (Briand y col., 1994).

Los procesos enzimáticos se prefieren a los métodos químicos debido al menor riesgo de reacciones colaterales y a su capacidad para tener lugar en condiciones fisiológicas, no desnaturizantes (Otte y col., 1997). Además, las enzimas proteolíticas son el mejor instrumento para analizar la secuencia de la proteína, así como para aislar y caracterizar los diferentes péptidos derivados de la misma.

Las enzimas se clasifican en función de su centro activo, del mecanismo de acción y de su estructura tridimensional. Las peptidasas o exopeptidasas (EC 3.4.11 a 3.4.17) hidrolizan los aminoácidos o dipéptidos de los extremos amino y carboxilo terminales. Las proteinasas o endopeptidasas (EC 3.4.21 a 3.4.24) hidrolizan los enlaces peptídicos internos de la proteína.

#### **1.3.2.1. Hidrólisis con enzimas digestivas**

El aislamiento y la caracterización de péptidos bioactivos se ha realizado fundamentalmente a partir de digeridos *in vitro* de proteínas lácteas (Brantl y col., 1979; Loukas y col., 1983; Maruyama y col., 1985; Fiat y Jollès, 1989; Meisel y col., 1991). Para ello, se han empleado las enzimas responsables de la digestión gastrointestinal, como la

pepsina del estómago y la tripsina y quimotripsina pancreáticas, simulando las condiciones fisiológicas del organismo en la liberación de péptidos con actividad biológica. Actualmente, se está llevando a cabo *in vivo* el aislamiento y la caracterización de péptidos inhibidores de la ACE a partir del quimo gastrointestinal (Meisel, 1986; Meisel y Frister, 1988).

En la Tabla 1 se muestran los péptidos inhibidores de la ACE obtenidos a partir de las caseínas y de las proteínas de suero por hidrólisis con enzimas digestivas. La estructura abierta y flexible de las caseínas les hace muy susceptibles a la hidrólisis, lo que permite la liberación de un gran número y variedad de péptidos (Yamamoto y Takano, 1999). Sin embargo, la susceptibilidad o la resistencia de las seroproteínas depende de la enzima y de las condiciones de hidrólisis.

La tripsina (EC 3.4.21.4) es una enzima pancreática liberada al intestino, donde hidroliza los enlaces peptídicos en los cuales el grupo carbonilo es cedido por la Lys o la Arg (Lehninger, 1991). Es la enzima más empleada para la hidrólisis de las caseínas, encaminada a la formación de péptidos inhibidores de la ACE (Maruyama y col., 1985, 1987a y b). Las casoquininas engloban un conjunto de péptidos liberados tras la acción de la tripsina sobre la  $\alpha_{s1}$ -CN y la  $\beta$ -CN (Ariyoshi, 1993). Son los fragmentos f(23-27) ( $\alpha_{s1}$ -casoquinina-5), f(23-34) ( $\alpha_{s1}$ -casoquinina-10), f(28-34) ( $\alpha_{s1}$ -casoquinina-7), f(91-92) ( $\alpha_{s1}$ -casoquinina-2), f(194-199) ( $\alpha_{s1}$ -casoquinina-6), f(177-183) ( $\beta$ -casoquinina-7) y f(193-202) ( $\beta$ -casoquinina-10) (Tabla 1).

La tripsina hidroliza lentamente la  $\alpha$ -La y actúa de manera ligeramente más rápida sobre la  $\beta$ -Lg (Otte y col., 1997). Sin embargo, se han aislado y caracterizado péptidos inhibidores de la ACE a partir de hidrolizados trípticos de estas proteínas (Chiba y Yoshikawa, 1986; Pihlanto-Leppälä y col., 2000). Esto puede ser debido a que bajos grados de hidrólisis permiten obtener hidrolizados de alta actividad. Mullally y col., (1997b) han descrito como determinante en la formación de péptidos bioactivos, la especificidad de las enzimas en mayor medida que el grado de hidrólisis.

La pepsina (EC 3.4.23.1), enzima gástrica, rompe los enlaces peptídicos X-Y, en los que X es un aminoácido hidrofóbico (Phe o Leu) y ambos aminoácidos no pueden ser

**Tabla 1.** Péptidos inhibidores de la ACE obtenidos por hidrólisis con enzimas digestivas de proteínas lácteas bovinas y humanas

Enzima	Péptido	Secuencia	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Referencia
Tripsina	$\alpha_{s1}$ -CN f(23-34)	FFVAPFPGVFGK	77	Maruyama y Suzuki, (1982)
Tripsina	$\alpha_{s1}$ -CN f(28-34)	FPGVFGK	n.d.	Ariyoshi, (1993)
Tripsina	$\alpha_{s1}$ -CN f(91-92)	YL	n.d.	Ariyoshi, (1993)
Tripsina	$\alpha_{s1}$ -CN f(194-199)	TTMPLW	16	Maruyama y col. (1987a)
Tripsina	$\alpha_{s1}$ -CN f(198-199)	LW	50	Maruyama y col. (1987a)
Tripsina	$\alpha_{s1}$ -CNh f(8-11)	YPER	132,5	Kim y col. (1999)
Tripsina	$\alpha_{s1}$ -CNh f(136-143)	YYPQIMQY	24,8	Kim y col. (1999)
Tripsina	$\alpha_{s1}$ -CNh f(164-170)	NNVMLQW	41	Kim y col. (1999)
Tripsina	$\beta$ -CN f(177-183)	AVPYPQR	15	Maruyama y col. (1985)
Tripsina	$\beta$ -CN f(60-66)	YFPFGPI	n.d.	Kayser y Meisel, (1996)
Tripsina	$\beta$ -CN f(177-183)	AVPYPQR	15	Maruyama y col. (1985)
Tripsina	$\beta$ -CN f(193-202)	YQQPVLGPVR	300	Meisel y Schlimme, (1994)
Tripsina	$\kappa$ -CN f(25-34)	YIPIQYVLSR	720	Yoshikawa y Chiba, (1992)
Tripsina	$\beta$ -Lg f(22-25)	LAMA	1062	Pihlanto-Leppälä y col. (2000)
Tripsina	$\beta$ -Lg f(32-40)	LDAQSAPLR	635	Pihlanto-Leppälä y col. (2000)
Tripsina	$\beta$ -Lg f(81-83)	VFK	1029	Pihlanto-Leppälä y col. (2000)
Tripsina	$\beta$ -Lg f(102-105)	YLLF	172	Chiba y Yoshikawa, (1986)
Tripsina	$\beta$ -Lg f(142-148)	ALPMHIR	42,6	Mullally y col. (1997a)
Tripsina	$\alpha$ -La f(99-108)	VGINYWLAHK	327	Pihlanto-Leppälä y col. (2000)
Tripsina	$\alpha$ -La f(104-108)	WLAHK	77	Pihlanto-Leppälä y col. (2000)
Tripsina	BSA f(208-216)	ALKAWSVAR	n.d.	Yoshikawa y Chiba, (1992)
Tripsina y peptidasa	$\alpha_{s1}$ -CN f(23-27)	FFVAP	6	Maruyama y col. (1985)
Tripsina y peptidasa	$\alpha_{s1}$ -CN f(197-199)	PLW	18	Maruyama y col. (1987a)

n.d.: dato no descrito

h: proteína humana

Val, Ala o Gly. La  $\beta$ -Lg bovina contiene muchos enlaces teóricamente susceptibles a la pepsina. Sin embargo, es resistente a la acción de dicha enzima (Reddy y col., 1988), debido a la estructura compacta de la proteína que oculta los aminoácidos hidrofóbicos susceptibles a la hidrólisis (Papiz y col., 1986; Brownlow y col., 1997). Se ha detectado mediante estudios *in vivo* la presencia de esta proteína intacta en el estómago (Yvon y col., 1984). La desnaturalización térmica parcial de la  $\beta$ -Lg supone la aparición de enlaces susceptibles a la pepsina. Por el contrario, la  $\alpha$ -La es sensible a la acción de la pepsina (Schmidt y van Marwijk, 1993), pero se requieren tiempos superiores a las tres horas para que se produzca la liberación de péptidos inhibidores de la ACE (Pihlanto-Leppälä y col., 2000). Sin embargo, hasta la actualidad no se han aislado secuencias peptídicas con esta actividad derivados de la acción de la pepsina sobre las proteínas lácteas.

La quimotripsina (EC 3.4.21.1) es otra enzima pancreática, que a nivel del intestino delgado hidroliza los enlaces peptídicos de las proteínas alimentarias, en los que el grupo carbonilo es aportado por un aminoácido aromático. Hidroliza rápidamente la  $\alpha$ -La, liberando un péptido de gran tamaño que se hidroliza de forma más gradual a otros fragmentos más pequeños. La  $\beta$ -Lg se hidroliza más lentamente, incrementándose el grado de hidrólisis en gran medida al incubar la reacción a mayor temperatura (Schmidt y Poll, 1991).

La combinación de las tres enzimas digestivas, pepsina, tripsina y quimotripsina ha permitido la liberación de péptidos de pequeño tamaño y con actividad inhibitoria de la ACE (Pihlanto-Leppälä y col., 2000). Otros péptidos, como el fragmento f(142-148) de la  $\beta$ -Lg, obtenido tras la acción de la tripsina no se hidroliza tras la incubación sucesiva con pepsina y quimotripsina. Su pequeño tamaño le hace inaccesible a estas enzimas, por lo que podría atravesar la barrera gastrointestinal y ejercer efectos sistémicos sobre la ACE (Mullally y col., 1997b). De manera análoga, los péptidos liberados a partir de las caseínas durante la digestión pueden absorberse a través de la barrera intestinal y ejercer efectos sistémicos. Así, Sekiya y col., (1992) han descrito la capacidad de un hidrolizado trípico de caseínas para provocar el descenso de la tensión arterial en humanos hipertensos, tras su administración por vía oral.

### 1.3.2.2. Hidrólisis con enzimas microbianas

Las enzimas microbianas han sido incorporadas de manera satisfactoria en la obtención de péptidos bioactivos. Así, el empleo de las enzimas procedentes de bacterias lácticas, como *Lactobacillus helveticus*, ha permitido la obtención de péptidos inhibidores de la ACE derivados de las caseínas. En la Tabla 2 se muestran los péptidos aislados a partir de hidrolizados de caseínas con enzimas microbianas, descritos como inhibidores de la ACE. Yamamoto y col., (1994) han empleado para la hidrólisis de las caseínas, una proteinasa asociada a la pared celular de la bacteria ácido-láctica *Lactobacillus helveticus* CP790. Esta enzima es capaz de hidrolizar la  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN y la  $\beta$ -CN. Hidroliza inicialmente los enlaces localizados en la región hidrofóbica C-terminal de la  $\beta$ -CN, aunque se ha visto que también es capaz de hidrolizar los enlaces situados en la zona N-terminal hidrofílica de la  $\alpha_{s1}$ -CN y de la  $\beta$ -CN (Zevaco y Gripon, 1988). Sin embargo, la  $\kappa$ -CN no es susceptible a la acción de dicha enzima. Los péptidos liberados, generalmente, son de gran tamaño y baja actividad inhibitoria de la ACE. Sólo el fragmento f(43-69) de la  $\beta$ -CN es muy activo, con un valor de  $IC_{50}$  de 4  $\mu$ M (Yamamoto y col., 1994).

La hidrólisis de las proteínas de suero se ha llevado a cabo con enzimas microbianas de distinto origen, fundamentalmente la proteinasa K y la termolisina. Los hidrolizados obtenidos tras la acción de estas enzimas sobre concentrados de proteínas de suero presentan porcentajes de inhibición de la ACE superiores al 95% (Saito y col., 1997). La proteinasa K (EC 3.4.21.14), procedente del *Tritirachium album*, rompe los enlaces X-Y, en los que Y es un aminoácido aromático o hidrofóbico. Hidroliza rápidamente la  $\alpha$ -La y la  $\beta$ -Lg (Schmidt y Poll, 1991). Abubakar y col., (1998) han aislado, a partir del hidrolizado de un suero de quesería con proteinasa K el péptido IPA, correspondiente al fragmento f(78-80) de la  $\beta$ -Lg, que presentó un valor de  $IC_{50}$  de 141  $\mu$ M.

La termolisina (EC 3.4.24.2), que procede de la bacteria *Bacillus thermoproteolyticus*, rompe los enlaces X-Y, en los que X es Leu, Phe, Ile, Val, Met o Ala e Y no debe ser Pro. Hidroliza lentamente las dos proteínas de suero mayoritarias. Sin embargo, se ha descrito la liberación de péptidos de pequeño tamaño en los primeros

**Tabla 2.** Péptidos inhibidores de la ACE obtenidos por hidrólisis de las caseínas bovinas con la proteinasa de *Lactobacillus helveticus* CP790

<b>Péptido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>Referencia</b>
α <sub>s1</sub> -CN f(104-109)	YKVPQL	22	Maeno y col. (1996)
α <sub>s1</sub> -CN f(1-6)	RPKHPI	>1000	Yamamoto y col. (1994)
α <sub>s1</sub> -CN f(1-9)	RPKHPIKHQ	>1000	Yamamoto y col. (1994)
α <sub>s1</sub> -CN f(24-30)	FVAPFPQV	>1000	Yamamoto y col. (1994)
α <sub>s1</sub> -CN f(143-148)	AYFYPE	106	Yamamoto y col. (1994)
α <sub>s1</sub> -CN f(155-168)	QLDAYPSGAWYYVP	>1000	Yamamoto y col. (1994)
α <sub>s1</sub> -CN f(158-161)	AYPS	>1000	Yamamoto y col. (1994)
α <sub>s1</sub> -CN f(162-169)	GAWYYVPL	>1000	Yamamoto y col. (1994)
α <sub>s1</sub> -CN f(170-199)	GTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	346	Yamamoto y col. (1994)
α <sub>s1</sub> -CN f(187-193)	GSENSEK	>1000	Yamamoto y col. (1994)
α <sub>s1</sub> -CN f(187-190)	GSEN	>1000	Yamamoto y col. (1994)
α <sub>s2</sub> -CN f(198-202)	TKVIP	400	Maeno y col. (1996)
α <sub>s2</sub> -CN f(189-192)	AMKPW	580	Maeno y col. (1996)
α <sub>s2</sub> -CN f(190-197)	MKPWIQPK	300	Maeno y col. (1996)
α <sub>s2</sub> -CN f(143-147)	AYFYP	>1000	Maeno y col. (1996)
α <sub>s2</sub> -CN f(189-197)	AMKPWIQPK	600	Maeno y col. (1996)
β-CN f(43-69)	DELQDKIHFAQTQSLVYPPFGPIPN	4	Yamamoto y col. (1994)
β-CN f(70-97)	LPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK	144	Yamamoto y col. (1994)
β-CN f(113-127)	KYPVQPFTESQSLTL	93	Yamamoto y col. (1994)
β-CN f(123-127)	QSLTL	>1000	Yamamoto y col. (1994)
β-CN f(158-175)	PPQSVLSLSQSKVLPVPE	25	Yamamoto y col. (1994)
β-CN f(161-175)	SKVLPVPE	39	Yamamoto y col. (1994)
β-CN f(176-182)	KAVPYPQ	>1000	Yamamoto y col. (1994)
β-CN f(177-182)	AVPYPQ	>1000	Yamamoto y col. (1994)
β-CN f(183-190)	RDMPIQAF	209	Yamamoto y col. (1994)
β-CN f(191-209)	LLYQQPVLGPVVRGPFPIIV	21	Yamamoto y col. (1994)
β-CN f(193-209)	YQQPVLGPVVRGPFPIIV	101	Yamamoto y col. (1994)



veinte minutos de incubación de estas seroproteínas con dicha enzima (Schmidt y Poll., 1991).

### **1.3.3. Péptidos lácteos inhibidores de la ACE obtenidos mediante procesos fermentativos**

La fermentación natural o controlada se ha explotado desde hace miles de años para preservar distintos alimentos y mantener o alterar sus propiedades nutritivas y/o sensoriales. Los lactobacilos y las bifidobacterias se han convertido en los probióticos más comúnmente empleados en la elaboración de distintos productos lácteos fermentados, como el yogur y el queso. Estas bacterias poseen un gran número de enzimas proteolíticas capaces de hidrolizar las proteínas lácteas liberando péptidos y aminoácidos, que le sirven como fuente de nitrógeno, esencial para su crecimiento. Además, estos péptidos liberados durante el proceso de fermentación pueden ejercer distintas actividades biológicas que podrían contribuir a las propiedades beneficiosas atribuidas a los productos lácteos fermentados y a las propias bacterias lácticas (Sanders, 1993; Lee y Salminen, 1995).

Algunos de los péptidos liberados tras la acción de los microorganismos durante la fermentación de la leche, pueden ejercer actividad inhibitoria de la ACE, por lo que los productos fermentados podrían ser empleados en la prevención y tratamiento de la hipertensión. Sin embargo, los resultados de los estudios difieren de unos autores a otros. Esto puede ser debido a determinados factores que pueden influir de manera importante en el desarrollo de la actividad. Los péptidos procedentes de los procesos fermentativos difieren en función de las propiedades cuali- y cuantitativas de las proteínas lácteas de las distintas especies (Fazel, 1998). Además, la acción de los fermentos es decisiva, por lo que las características del producto final dependerán de la especie y cepa del cultivo iniciador empleada en el proceso de fermentación (Yamamoto, 1997; Matar y col., 1997).

Tanto las bacterias ácido-lácticas empleadas como cultivo iniciador, como la microflora endógena de la leche poseen un sistema proteolítico constituido por proteinasas unidas a la pared celular y peptidasas intracelulares (Kunji y col., 1996). Durante el procesado y el almacenamiento de los productos fermentados, las proteinasas son capaces de hidrolizar las proteínas del alimento a fermentar y generar oligopéptidos (Harwalkar y

McMahon, 1993). Los di-, tri- y oligopéptidos de pequeño tamaño pueden ser transportados, mediante sistemas de transporte específicos de la bacteria, hasta el interior de la célula, donde las peptidasas de la membrana plasmática los hidrolizan formándose péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres. Además, los péptidos de mayor tamaño que no pueden ser transportados al interior de la célula también pueden ser fuente de péptidos bioactivos tras su degradación por la peptidasas intracelulares liberadas durante la lisis celular (Thomas y Pritchard, 1987; Poolman y col., 1995; Law y Haandrikman, 1997). Los péptidos originados contribuyen, por tanto, al cambio en las propiedades reológicas, sensoriales y biológicas del producto fermentado (Korhonen y col., 1998).

Sin embargo, Meisel y Bockelmann, (1999) han manifestado que, durante la elaboración de leches fermentadas y debido a la breve duración del proceso y a la especificidad de las enzimas peptidásicas, es poco probable la liberación de péptidos bioactivos. La actividad proteolítica de las bacterias lácticas es baja y sólo provoca la hidrólisis del 1-2% de las proteínas de la leche durante el proceso de elaboración del yogur (Perdignon y col., 1991). Sin embargo, otros autores han descrito la capacidad de las proteinasas de las bacterias lácticas para hidrolizar más del 40% de los enlaces peptídicos de las caseínas (Juillard y col., 1995; Kunji y col., 1996; Mierau y col., 1997), generándose un gran número de péptidos, que podrían ser degradados por el sistema peptidásico y liberar péptidos bioactivos. La discrepancia entre los distintos autores puede ser debida a la dependencia del grado de proteolisis en función de las especies y cepas de microorganismos empleadas en cada estudio (Marshall y Tamine, 1997), así como de las condiciones del proceso de fermentación.

#### **1.3.3.1. Péptidos inhibidores de la ACE en leches fermentadas**

En la Tabla 3 se muestran las secuencias peptídicas descritas como inhibidoras de la ACE, formadas tras la acción de diferentes cepas de bacterias lácticas sobre las caseínas. Las cepas de *Lactobacillus helveticus* poseen mayor actividad proteolítica sobre las proteínas lácteas que otras cepas de bacterias lácticas, por lo que el contenido peptídico de la leche fermentada por esta bacteria es mayor (Yamamoto y col., 1994). A partir de esta leche fermentada, Yamamoto y col., (1999) han aislado el péptido de secuencia YP, que

**Tabla 3.** Péptidos inhibidores de la ACE obtenidos por procesos fermentativos a partir de  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\beta$ -CN y  $\kappa$ -CN

Fragmento	Secuencia	IC <sub>50</sub> (μM)	Bacterias lácticas	Referencia
$\alpha_{s1}$ -CN f(146-147)	YP	720	<i>Lactobacillus helveticus</i> CPN4	Yamamoto y col. (1999)
$\beta$ -CN f(114-115)				
$\kappa$ -CN f(58-59)				
$\beta$ -CN f(177-183)	AVPYPQR	15	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> (Lb. GG)	Rokka y col. (1997)
$\beta$ -CN f(193-202)	YQEPVLGPVR	n.d.	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> (Lb. GG)	Rokka y col. (1997)
$\beta$ -CN f(84-86)	VPP	9	<i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nakamura y col. (1995)
$\beta$ -CN f(74-76)	IPP	5	<i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nakamura y col. (1995)
$\kappa$ -CN f(108-110)				
$\beta$ -CN f(6-14)	LNVPGEIVE	290.7	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> SS1	Gobbetti y col. (2000)
$\beta$ -CN f(73-82)	NIPPLTQTPV	179.8	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> SS1	Gobbetti y col. (2000)
$\beta$ -CN f(47-52)	DKIHPF	193.9	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> FT4	Gobbetti y col. (2000)
$\kappa$ -CN f(152-160)	VIGSPPEINK	> 1000	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> FT4	Gobbetti y col. (2000)

n.d.: dato no descrito

puede proceder de la  $\alpha_{s1}$ -CN, la  $\beta$ -CN y/o la  $\kappa$ -CN. Su actividad inhibitoria de la ACE es baja ( $IC_{50} = 720 \mu\text{M}$ ). Se han aislado otros péptidos inhibidores de la ACE formados a partir de  $\beta$ -CN y  $\kappa$ -CN durante la fermentación de la leche con otras bacterias lácticas, como *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (*Lactobacillus* GG) (Rokka y col., 1997), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Gobbetti y col., 2000).

Actualmente, en el aislamiento y la caracterización de péptidos inhibidores de la ACE se están empleando algunas cepas de levaduras, capaces de hidrolizar las proteínas lácteas. Así, la combinación de *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* ha permitido la obtención de una bebida fermentada, con capacidad para prolongar la vida en animales de experimentación e inhibir tumores inducidos en ratas F344 (Arai y col., 1980; Takano y col., 1985). Además, se ha observado su capacidad inhibitoria de la ACE. A partir de esta leche fermentada se han aislado dos tri-péptidos, de secuencia VPP, fragmento f(84-86) de la  $\beta$ -CN e IPP, fragmentos f(74-76) y f(108-110) de la  $\beta$ -CN y la  $\kappa$ -CN, respectivamente (Nakamura y col., 1995). Los valores de  $IC_{50}$  son muy bajos, de  $9 \mu\text{M}$  para el péptido VPP y de  $5 \mu\text{M}$  para el péptido IPP. Estos dos fragmentos no se obtienen por la hidrólisis de las caseínas con la proteinasa aislada de *Lactobacillus helveticus*, lo que demuestra la acción de las peptidasas intracelulares durante la fermentación (Yamamoto y Takano, 1999).

En algunos casos y debido al corto tiempo del proceso de fermentación, ha sido necesario llevar a cabo la hidrólisis de la leche o del suero con enzimas digestivas o microbianas previa a la fermentación. Así, Saito y col., (1997) no han observado cambios en la actividad inhibitoria de la ACE tras el proceso de fermentación de un suero de quesería con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* con respecto a la actividad del suero hidrolizado con proteinasa K. Esta enzima se está empleando en la producción de una bebida fermentada obtenida a partir de suero de quesería. Sin embargo, en el suero hidrolizado con pepsina, tripsina y termolisina, la fermentación con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, produjo disminución de la actividad. Este descenso puede ser debido al consumo parcial por los microorganismos de los péptidos bioactivos como fuente de nitrógeno, tras la hidrólisis de los mismos por las peptidasas bacterianas.

Por el contrario, el proceso de fermentación previo a la hidrólisis supone un incremento de la actividad. Así, Rokka y col., (1997) han descrito altos valores de actividad inhibitoria de la ACE en una leche fermentada con *Lactobacillus* GG y posteriormente hidrolizada con tripsina y pepsina. Incluso, se han aislado péptidos con actividad inhibitoria de la ACE procedentes de la  $\alpha$ -La y de la  $\beta$ -Lg a partir de un suero fermentado e hidrolizado con una combinación de pepsina y tripsina (Pihlanto-Leppälä y col., 1998).

### 1.3.3.2. Péptidos inhibidores de la ACE en quesos

Se han descrito péptidos con distintas actividades biológicas liberados durante el proceso de elaboración del queso, como las casomorfinas inmunoreactivas con actividad agonista opiácea e inmunomodulante (Hamel y col., 1985) y los fosfopéptidos con actividad anticariogénica (Addeo y col., 1992; Roudot-Algaron y col., 1994). Además, se han encontrado varios péptidos con actividad inhibitoria de la ACE formados durante el proceso proteolítico que tiene lugar durante la maduración del queso.

En la Tabla 4 se muestran los péptidos descritos como inhibidores de la ACE y presentes en distintos tipos de quesos. La especie de la leche de partida, el tipo de cultivo iniciador y las condiciones del proceso de maduración pueden influir en la actividad inhibitoria de la ACE del producto final. Okamoto y col., (1995) han comprobado la actividad inhibitoria de la ACE en quesos maduros como el Camembert, quesos azules y el Cheddar rojo, mientras que en quesos frescos con bajo nivel de proteolisis, como el queso Cottage no encontraron dicha actividad. Este hecho fue confirmado por Meisel y col., (1997) que, al determinar el porcentaje de inhibición de los extractos solubles en agua y de los extractos ultrafiltrados menores de 1000 Da de distintos quesos, encontraron porcentajes próximos al 70% en quesos madurados e inferiores al 13 y al 27% en queso fresco y queso Quarg, respectivamente.

La proteolisis que tiene lugar durante el proceso de maduración del queso es el proceso responsable del incremento de la actividad inhibitoria de la ACE hasta un cierto nivel, a partir del cual comienza a disminuir dicha actividad. Así, la actividad inhibitoria de la ACE en el queso Gouda de 24 meses de maduración fue del 34,6%, mientras que en el

**Tabla 4.** Péptidos inhibidores de la ACE obtenidos a partir de diferentes quesos

Queso	IACE (%)	Péptido	Secuencia	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	Referencia
Azul	49.9			n.d.	Saito y col. (2000)
				0.27	Okamoto y col. (1995)
Camembert	69.1			n.d.	Saito y col. (2000)
	37.0			n.d.	Meisel y col. (1997)
				0.16	Okamoto y col. (1995)
Cottage	N.D.			N.D.	Okamoto y col. (1995)
Crescenza	n.d.	$\beta$ -CN f(58-72)	LVTPFPGPIHNSLPQ	n.d.	Smacchi y Gobbetti, (1998)
Cheddar	70.1			n.d.	Meisel y col. (1997)
	n.d.	$\beta$ -CN f(58-72)	LVTPFPGPIHNSLPQ	n.d.	Stepaniak y col. (1995)
	n.d.	$\beta$ -CN f(43-52)	DELQDKIHPF	n.d.	Jiang y col. (1998)
Red Cheddar				0.16	Okamoto y col. (1995)
Edam	56.2			n.d.	Saito y col. (2000)
	55.9			n.d.	Meisel y col. (1997)
Emmental	48.8			n.d.	Saito y col. (2000)
	59.6			n.d.	Meisel y col. (1997)
Feta	n.d.	$\beta$ -CN f(60-68)	YPFPGPIP	n.d.	Saito y col. (2000)
Gouda reciente	51.8			n.d.	Saito y col. (2000)
Gouda 8 meses	75.5	$\alpha_{s1}$ -CN f(1-9)	RPKHPIKHQ	13.4	Saito y col. (2000)
		$\alpha_{s1}$ -CN f(1-13)	RPKHPIKHHQGLPQ	n.d.	Saito y col. (2000)
		$\beta$ -CN f(60-68)	YPFPGPIP	14.8	Saito y col. (2000)
		$\beta$ -CN f(109-119)	MPFPKYPVQPF	n.d.	Saito y col. (2000)
	70.0				Meisel y col. (1997)
Gouda 24 meses	78.2			n.d.	Saito y col. (2000)
	34.6			n.d.	Meisel y col. (1997)
Harz	26.1			n.d.	Meisel y col. (1997)
Havarti	72.7			n.d.	Saito y col. (2000)
Leerdam	71.3			n.d.	Meisel y col. (1997)
Parmesano	20.5			n.d.	Meisel y col. (1997)
Quarg	26.6			n.d.	Meisel y col. (1997)
Roquefort	73.1			n.d.	Meisel y col. (1997)

n.d.: dato no descrito

N.D.: actividad no detectada

de 8 meses fue del 70,0% (Meisel y col., 1997). Este descenso de la actividad con el tiempo de maduración se había observado durante el aislamiento de péptidos derivados de la  $\alpha_{s1}$ -CN, que fue posible en el queso Parmesano de 6 meses de maduración y no pudieron detectarse en el mismo queso de 15 meses de maduración (Addeo y col., 1992). Estos resultados indican que los péptidos con actividad inhibitoria de la ACE liberados tras la acción de las enzimas proteolíticas de las bacterias lácticas durante el proceso de maduración, son degradados posteriormente a fragmentos inactivos (Meisel y col., 1997). De manera análoga, la disminución de la actividad inhibitoria de la ACE de un queso “Festivo”, semimaduro y elaborado con fermentos convencionales y cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, durante un almacenamiento prolongado, ha sido descrita por Ryhänen y col., (2001).

En los últimos años, se ha iniciado el aislamiento y la caracterización de péptidos inhibidores de la ACE a partir de distintos tipos de quesos. Así, se han aislado fragmentos peptídicos, como el fragmento f(58-72) de la  $\beta$ -CN en el queso Crescenza (Smacchi y Gobbetti, 1998) y los fragmentos f(58-72) y f(43-52) de la  $\beta$ -CN en el queso Cheddar (Stepaniak y col., 1995; Jiang y col., 1998). A partir del queso Gouda de 8 meses de maduración se han aislado varios fragmentos liberados de la  $\alpha_{s1}$ -CN y la  $\beta$ -CN con alta actividad inhibitoria de la ACE (Saito y col., 2000), como el fragmento f(60-68) de la  $\beta$ -CN, aislado por estos mismos autores a partir del queso Feta (Tabla 4). Haileselasie y col., (1999) han extraído una fracción con fragmentos derivados de las caseínas y precursores de péptidos antihipertensivos a partir de un queso modificado enzimáticamente, producido por *Lactobacillus casei* y distintas enzimas comerciales.

#### **1.3.4. Péptidos lácteos inhibidores de la ACE obtenidos mediante síntesis química**

Actualmente, se está empleando la síntesis química para la obtención de péptidos con actividad inhibitoria de la ACE (Gallop y col., 1994; Gordon y col., 1994), que son sometidos a estudios sobre su actividad biológica, mecanismo de inhibición, sitios de glicosilación (Hansen y col., 1995) y zonas susceptibles a la hidrólisis (Nielsen y col., 1997).

Además, la síntesis de péptidos juega un papel muy importante en los estudios que establecen la relación estructura/actividad. Un péptido de pequeño tamaño puede existir en múltiples estados conformacionales, adoptando diversas disposiciones espaciales para unirse a los sitios activos de los receptores o de las enzimas (Schlimme y Meisel, 1995). Sin embargo, dependiendo de la secuencia aminoacídica de la cadena peptídica y del ambiente molecular se favorecen ciertas conformaciones. La relación estructura/actividad de los péptidos inhibidores de la ACE indica la influencia de la secuencia tri-peptídica del extremo carboxilo terminal en la unión a la enzima (Meisel, 1993a). El potencial electrostático molecular se define como las interacciones electrostáticas entre los péptidos y un protón, por lo que su análisis permite observar las interacciones de las distintas partes de la molécula con sitios de unión nucleofílicos o electrofílicos (potencial positivo o negativo). Se ha visto que el potencial electrostático molecular de los péptidos inhibidores de la ACE posee un patrón característico similar entre ellos y distinto al de los péptidos no inhibidores. Se ha observado que el potencial positivo similar en las secuencias activas se encuentra localizado en el extremo carboxilo terminal (Meisel, 1993b).

En la Tabla 5 se detallan los péptidos sintetizados y descritos como inhibidores de la ACE a partir de las caseínas de distintas especies y de las proteínas de suero. Aunque existen diferencias en la secuencia de  $\beta$ -CN humana, bovina, de búfalo, ovina, de rata y de ratón, hay muchas regiones similares (Kohmura y col., 1989). Así, el fragmento f(21-41) de la  $\beta$ -CN humana constituye una zona muy rica en Pro. Once de estas Pro están situadas de manera semejante en las otras cinco especies y 23 están situadas en la misma posición en la proteína de vaca, búfalo y oveja. Sin embargo, las variaciones en la secuencia aminoacídica de un péptido puede suponer el incremento o descenso de la actividad inhibitoria de la ACE. Así, la sustitución de la Lys por Glu en la posición 56 del péptido KAIP, fragmento f(56-59) derivado de la  $\beta$ -CN de rata, da lugar al péptido QAIP derivado de la proteína de ratón, que presenta un valor de  $IC_{50}$  mucho mayor (Kohmura y col., 1990a).

También son importantes las sustituciones de aminoácidos en las cadenas proteicas de una misma especie que conducen a la formación de distintas variantes genéticas. Estas variantes, por la diferente susceptibilidad al ataque enzimático, pueden dar lugar a la formación de nuevos péptidos inhibidores de la ACE, así como al aumento, disminución,



**Tabla 5.** Péptidos lácteos inhibidores de la ACE obtenidos por síntesis química

<b>Péptido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>Referencia</b>
α <sub>s1</sub> -CN f(24-27)	FVAP	10	Maruyama y col. (1987b)
α <sub>s1</sub> -CN f(25-27)	VAP	2	Maruyama y col. (1987b)
α <sub>s1</sub> -CN f(23-27)	FFVAP	6	Maruyama y col. (1987b)
α <sub>s1</sub> -CN f(23-34)	FFVAPFPEVFGK	77	Maruyama y col. (1987b)
α <sub>s1</sub> -CN f(28-34)	FPEVFGK	140	Maruyama y col. (1987b)
α <sub>s1</sub> -CN f(32-34)	FGK	160	Maruyama y col. (1987b)
β-CN f(80-90)	TPVVVPPFLQP	749	Abubakar y col. (1998)
β-CN f(169-174)	KVLPVP	5	Maeno y col. (1996)
β-CN (11 fragmentos)		< 100	Kohmura y col. (1990a)
β-CN f(58-61)	LVYP	170	Kohmura y col. (1990a)
β-CN <sub>r</sub> (11 fragmentos)		100-1000	Kohmura y col. (1990a)
hβ-CN <sub>h</sub> (32 fragmentos)		< 100	Kohmura y col. (1989)
β-CN <sub>h</sub> (28 fragmentos)		100-1000	Kohmura y col. (1989)
β-CN <sub>h</sub> (10 fragmentos)		> 1000	Kohmura y col. (1989)
κ-CN <sub>h</sub> (15 fragmentos)		< 100	Kohmura y col. (1990b)
κ-CN <sub>h</sub> (7 fragmentos)		100-1000	Kohmura y col. (1990b)
κ-CN <sub>h</sub> f(76-80)	PNSHP	> 1000	Kohmura y col. (1990b)
β-Lg f(102-103)	YL	122	Mullally y col. (1996)
β-Lg f(104-105)	LF	349	Mullally y col. (1996)
β-Lg f(146-149)	HIRL	1153.2	Mullally y col. (1996)
β-Lg f(147-148)	IR	695.5	Mullally y col. (1996)
β-Lg f(148-149)	RL	2438.9	Mullally y col. (1996)
α-La f(18-19)	YG	>1000	Mullally y col. (1996)
α-La f(50-53)	YGLF	733	Chiba y Yoshikawa, (1986)
α-La f(50-51)	YG	>1000	Mullally y col. (1996)
BSA f(221-222)	FP	315	Abubakar y col. (1998)

r: proteína de rata y de ratón

h: proteína humana

pérdida de actividad o a la liberación de péptidos con otra actividad biológica. El polimorfismo genético afecta fundamentalmente a la  $\beta$ -Lg y a la  $\beta$ -CN (Dziuba y col., 1999). Así, por ejemplo, la sustitución del aminoácido Gln<sub>59</sub> en la variante B de la  $\beta$ -Lg bovina por Hys de la variante C, afecta a la zona vecina al péptido f(60-61) con actividad inhibitoria de la ACE.

Además, se han propuesto sustituciones dirigidas para mejorar las propiedades físico-químicas y funcionales de la  $\beta$ -Lg. La sustitución de la Arg<sub>40</sub> por Cys en la secuencia de la  $\beta$ -Lg afecta al péptido f(41-42), con actividad inhibitoria de la ACE. Además, la Arg<sub>40</sub> aporta un grupo carbonilo susceptible a la hidrólisis triptica, por lo que los péptidos liberados tras la acción de esta enzima pueden ser diferentes (Batt y col., 1994).

### **1.3.5. Otras estrategias de obtención e identificación de péptidos lácteos inhibidores de la ACE**

Actualmente se encuentra en fase de estudio otra estrategia encaminada a la obtención de péptidos activos y con un futuro prometedor, la ingeniería genética. Kim y col., (1999) han hidrolizado con tripsina la  $\alpha$ <sub>s1</sub>-CN recombinante humana expresada en *Escherichia coli* (Kim y col., 1997). A partir de este hidrolizado se han aislado y purificado tres péptidos con actividad inhibitoria de la ACE, los fragmentos f(8-11), f(136-143) y f(164-170), que presentan valores de IC<sub>50</sub> de 132,5, 24,8 y 41,0  $\mu$ M, respectivamente. Los tres fragmentos son resistentes a la hidrólisis por la quimotripsina y los fragmentos f(8-11) y f(164-170) resisten también la acción de la pepsina, por lo que ofrecen la posibilidad del empleo por vía oral en el tratamiento de la hipertensión.

Para llevar a cabo la identificación de péptidos con actividad inhibitoria de la ACE pueden emplearse bases de datos que contengan secuencias peptídicas bioactivas derivadas de otras proteínas que puedan ser similares a las secuencias de las proteínas lácteas. En las bases de datos se muestran péptidos inhibidores de la ACE obtenidos por síntesis química o ingeniería genética (Dziuba y col., 1999). En la Tabla 6 se detallan los péptidos procedentes de la  $\beta$ -CN y de la  $\beta$ -Lg identificados como inhibidores de la ACE mediante bases de datos.

**Tabla 6.** *Péptidos inhibidores de la ACE identificados por bases de datos y derivados de la  $\beta$ -CN y la  $\beta$ -Lg bovina*

<b>Péptido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Referencia</b>
$\beta$ -CN f(132-136)	NLHLP	Kohmura y col. (1989)
$\beta$ -CN f(133-136)	LHLP	Kohmura y col. (1989)
$\beta$ -CN f(150-152)	PLP	Kohmura y col. (1989)
$\beta$ -CN f(170-172)	VLP	Kohmura y col. (1989)
$\beta$ -CN f(88-90)	LQP	Miyoshi y col. (1991)
$\beta$ -CN f(59-60)	VY	Saito y col. (1994b)
$\beta$ -CN f(156-157)	MF	Matsufuji y col. (1994)
$\beta$ -CN f(192-193)	LY	Matsufuji y col. (1994)
$\beta$ -CN f(135-137;151-153)	LPP	Maruyama y col. (1989b)
$\beta$ -Lg f(3-4;41-42)	VY	Saito y col. (1994b)
$\beta$ -Lg f(93-95)	LVL	Hazato y Kase, (1986)
$\beta$ -Lg f(122-124)	LVR	Maruyama y col. (1989a)
$\beta$ -Lg f(81-82)	VF	Matsufuji y col. (1994)
$\beta$ -Lg f(60-61)	KW	Matsufuji y col. (1994)
$\beta$ -Lg f(40-42)	RVY	Matsufuji y col. (1994)

### 1.3.6. Efectos *in vivo* de los péptidos lácteos inhibidores de la ACE

La capacidad de un péptido para desarrollar la actividad antihipertensiva *in vivo* depende de distintos factores, como el procesado al que ha sido sometido el alimento, la estabilidad del péptido, la capacidad de absorción y el mecanismo de inhibición de la ACE (Yamamoto y Takano, 1999). Los péptidos bioactivos pueden originarse durante el procesado de los alimentos. Así, las formulas infantiles hipoalergénicas y las fórmulas enterales se elaboran con proteínas parcialmente hidrolizadas. El procesado de los alimentos puede, además, promover la conversión racémica de los L-aminoácidos, presentes de forma natural en los alimentos en D-aminoácidos, lo que puede ocasionar la formación de péptidos indigeribles por el organismo, afectando a su proceso de absorción (Meisel, 1998).

Los péptidos bioactivos también pueden formarse durante el proceso de digestión en el tracto gastrointestinal. La digestibilidad está influida por las condiciones del procesado y por las interacciones antagónicas y sinérgicas con otros componentes de la dieta (Meisel y col., 1989). Los péptidos de bajo peso molecular son muy reactivos, pudiendo interactuar con carbohidratos y lípidos. Una vez hidrolizados los fragmentos por las enzimas digestivas, pepsina, tripsina y quimotripsina, fundamentalmente, los péptidos liberados pueden ejercer el efecto a nivel del tracto digestivo, actuando sobre los receptores de la mucosa intestinal. Las peptidasas de las microvellosidades pueden hidrolizar los péptidos, liberando los aminoácidos o di-péptidos de los extremos amino y carboxilo terminales (Kenny y Maroux, 1982; Yoshioka y col., 1987). Aquellos péptidos resistentes a la hidrólisis pueden ser absorbidos a través de la barrera intestinal y alcanzar la circulación sistémica. Se ha demostrado un mecanismo de transporte de di- y tri-péptidos independiente de la secuencia aminoacídica (Döring y col., 1998). Al llegar a la sangre, los péptidos deben resistir la acción de las peptidasas presentes en el suero sanguíneo y alcanzar los receptores diana de los órganos, pudiendo ejercer distintos efectos sistémicos. Por lo tanto, las diferencias entre los resultados obtenidos *in vivo* y la actividad inhibitoria de la ACE *in vitro* se deben a la afinidad de los péptidos al mecanismo de transporte a través de la barrera intestinal y a la resistencia a las peptidasas, tanto intestinales como sanguíneas (Saito y col., 1994a). Además, una elevada actividad antihipertensiva en fragmentos con baja actividad inhibitoria de la ACE puede ser debida a

la acción de dichos fragmentos mediante otro mecanismo de acción. Esto se ha observado en fragmentos de las caseínas, como el fragmento f(169-175) de la  $\beta$ -CN (Maeno y col., 1996).

Se han llevado a cabo distintos estudios con animales de experimentación y ensayos clínicos encaminados a determinar la actividad antihipertensiva de hidrolizados de caseínas y de proteínas de suero con enzimas digestivas y microbianas. Así, se ha comprobado el descenso de la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas tras la administración intraperitoneal y oral de un hidrolizado de caseínas y de los fragmentos f(23-34) y f(194-199) de la  $\alpha_{s1}$ -CN y f(177-183) de la  $\beta$ -CN (Karakı y col., 1990). De manera similar se ha observado este efecto en humanos hipertensos (Sekiya y col., 1992). La hidrólisis de suero de quesería con la proteinasa K conduce a la obtención de un hidrolizado con efecto depresor de la presión sistólica en ratas espontáneamente hipertensas, siendo el máximo responsable de esta actividad el péptido IPA, fragmento f(78-80) derivado de la  $\beta$ -Lg (Abubakar y col., 1998).

Los estudios *in vivo* también se han llevado a cabo en productos lácteos fermentados con distintas bacterias lácticas. La actividad antihipertensiva puede ser debida a la inhibición de la ACE o bien a otros mecanismos de acción. La leche fermentada Calpis<sup>®</sup> produce la disminución de la presión sistólica en ratas espontáneamente hipertensas (Nakamura y col., 1995; Takano, 1998) y en humanos hipertensos (Hata y col., 1996). A partir de esta leche se han aislado los fragmentos VPP e IPP, de alta actividad inhibitoria de la ACE. Debido a la resistencia conferida por la Pro (Kim y col., 1972), estos péptidos no se degradan a nivel digestivo, por lo que se absorben intactos (Hara y col., 1984) y alcanzan la aorta abdominal, produciendo el efecto antihipertensivo. Además, el tratamiento de humanos hipertensos con esta leche no altera el metabolismo lipídico ni produce los efectos colaterales característicos de los fármacos antihipertensivos, como los diuréticos y los  $\beta$ -bloqueantes (Hata y col., 1996).

Sin embargo, otros péptidos como el fragmento YP, presente en la secuencia de la  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\beta$ -CN y  $\kappa$ -CN y aislado de una leche fermentada con *Lactobacillus helveticus* presentan baja actividad inhibitoria de la ACE y alta actividad antihipertensiva (Yamamoto y col., 1994). Este efecto antihipertensivo puede deberse a la inhibición de la quimasa,

enzima responsable de la formación de la angiotensina-II en el corazón y en los vasos coronarios (Urata y col., 1993). Otro mecanismo de acción antihipertensiva en humanos hipertensos ha sido descrito por Kuwabara y col., (1995) en una leche fermentada con una combinación de bacterias lácticas y *Lactobacillus casei*. Este mecanismo involucra la acción de unos compuestos polisacáridos glicopeptídicos que mejoran la síntesis de las prostaglandinas I<sub>2</sub> y reducen la resistencia vascular periférica (Sawada y col., 1990).

### **1.3.7. Perspectivas futuras de los péptidos bioactivos. Alimentos funcionales**

Los “alimentos funcionales” se definen según el International Life Science Institute (ILSI) como aquellos alimentos que aportan efectos beneficiosos sobre una o más funciones fisiológicas, más allá de los efectos nutricionales, y que van encaminados a mejorar el estado de salud y bienestar o a reducir el riesgo de trastornos en el organismo (Diplock y col., 1998). Según el proyecto FUFOSSE (Functional Food Science in Europe), un “alimento funcional” debe cumplir ciertos requisitos. En primer lugar, debe ser consumido habitual o diariamente como parte de la dieta normal. Debe estar constituido por ingredientes naturales no presentes en el alimento original o en mayor concentración a la existente en dicho alimento. Sus efectos beneficiosos deben demostrarse científicamente y deben ser distintos a los meramente nutritivos. Además, deben mejorar el estado de salud del individuo, su calidad de vida y/o disminuir el riesgo de ciertas patologías. Finalmente, sus efectos deben estar autorizados.

La obtención de alimentos funcionales puede llevarse a cabo por la adición de probióticos, prebióticos, simbióticos o ingredientes funcionales. Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se ingieren en cantidades suficientes, ejercen efectos positivos en la salud, adicionales a los meramente nutricionales (Schaafsma, 1996). Se incluyen los efectos beneficiosos de estos microorganismos sobre el hospedador, mejorando su balance microbiano intestinal (Füller, 1992). El crecimiento de los microorganismos del tracto gastrointestinal puede promoverse también por los prebióticos o compuestos alimentarios, generalmente de naturaleza oligosacáridica, no digeribles pero fermentables por distintas especies de bacterias lácticas (Gibson y Roberfroid, 1995; Schaafsma, 1997). La combinación de los probióticos y prebióticos, denominada

simbióticos, mejora la supervivencia de los primeros, además de producir una mayor colonización de la microflora colónica (Roberfroid, 1999).

Los péptidos bioactivos se incluyen en el grupo de ingredientes funcionales de naturaleza proteica, que permiten la obtención de alimentos funcionales. La liberación de los péptidos bioactivos a partir de una secuencia proteica puede producirse bien por hidrólisis enzimática (Abubakar y col., 1998; Pihlanto-Leppälä y col., 2000), por procesos fermentativos (Yamamoto y col., 1999; Gobbetti y col., 2000) o bien por la combinación de ambos procesos, que tiene lugar bien durante el procesado de alimentos o bien durante la digestión gastrointestinal (Pihlanto-Leppälä y col., 1998). El empleo de microorganismos modificados genéticamente que expresan la secuencia peptídica bioactiva está abriendo un nuevo campo en la obtención de péptidos con actividades biológicas (Kim y col., 1997 y 1999).

Dentro del grupo de los péptidos bioactivos, aquellos con actividad antihipertensiva han centrado el interés de los científicos y las industrias, debido al incremento de la mortalidad en los países industrializados por la hipertensión y/o por sus complicaciones renales, cardíacas o cerebrales. Ya han comenzado a comercializarse algunos alimentos con propiedades antihipertensivas. En Japón, se comercializa un “Food for Special Health Uses” o FOSHU, que contiene el dodecapéptido f(23-34) derivado de la  $\alpha_{s1}$ -CN. Se ha demostrado su acción preventiva de la hipertensión y de los trastornos del sistema circulatorio (Sugai, 1998). Además, con esta misma actividad han comenzado a comercializarse distintos productos lácteos fermentados. En Japón, la leche fermentada Calpis<sup>®</sup> (Takano, 1998), elaborada con *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* y en Finlandia, la leche fermentada Evolus<sup>®</sup> (Leporanta, 2001), elaborada con *Lactobacillus helveticus*, reducen la presión sanguínea en pacientes hipertensos tras la acción inhibitoria de la ACE de los tri-péptidos VPP e IPP. Ambas leches fermentadas ya se comercializan como alimentos funcionales preventivos de la hipertensión en los países de origen.

Además de utilizar los péptidos bioactivos como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales, dichos péptidos pueden formar parte de preparaciones farmacéuticas, aplicadas en la prevención y el tratamiento de distintos trastornos del

organismo. Así, los caseinofosfopéptidos se están aplicando por su efecto recalificante dental en el tratamiento de la caries (Reynolds, 1987), en procesos de mala absorción de minerales (Brule y col., 1982). Igualmente, los inmunopéptidos derivados de la  $\kappa$ -CN y de la  $\alpha$ -La se están empleando en el tratamiento de síndromes de inmunodeficiencia, como el SIDA (Hadden, 1991).

Sin embargo, son necesarios nuevos estudios que incrementen y diversifiquen las aplicaciones dietéticas y farmacéuticas de los péptidos bioactivos. Estos estudios persiguen determinados objetivos (Pihlanto-Leppälä, 2001):

- Estudio de las interacciones de los péptidos durante el procesado de los alimentos y de los efectos de dichas interacciones sobre la actividad biológica de los péptidos y sobre la formación de sustancias tóxicas, alergénicas o cancerígenas.
- Estudios moleculares que determinen o aseguren el mecanismo de acción del péptido.
- Evaluación de los efectos de los péptidos, tanto aislados como constituyentes del alimento, mediante sistemas modelo con animales de experimentación y ensayos clínicos.
- Desarrollo de nuevas técnicas de purificación y enriquecimiento de fracciones activas, como técnicas de membrana y técnicas cromatográficas, que disminuyan el alto coste de la obtención de péptidos en grandes cantidades, necesarias para los ensayos en humanos.
- Evaluación de la seguridad de los péptidos que clarifique los efectos colaterales adversos.
- Determinación de la dosis.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **2.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA ACE DERIVADOS DE LA $\beta$ -LG OVINA Y CAPRINA**

### **2.1.1. Muestras**

Muestras de leche de oveja y de cabra procedentes de la empresa Queserías Campo Real, S.A. (Madrid, España) se desnataron tras atemperar a 30-35°C durante 25 minutos, centrifugar a 2500  $\times g$  a 20°C durante 30 minutos, enfriar en hielo, eliminar la grasa con una espátula y filtrar a través de lana de vidrio.

A partir de estas muestras de leche de oveja y de cabra se obtuvo el suero ácido y el suero dulce. La obtención del suero ácido se llevó a cabo ajustando el pH de las muestras con ácido clorhídrico 1 N a 4,6 y 4,1, respectivamente. Tras dejar reposar la leche durante 25 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 4500  $\times g$  durante 20 minutos a una temperatura de 5°C. El sobrenadante se filtró a través de papel Whatman n° 40.

El suero dulce se obtuvo durante el proceso de elaboración de un queso de leche de oveja en una quesería a escala semipiloto (modelo FT 20 de Armfield Technical Education Co. Ltd.). Se partió de 8 litros de leche cruda desnatada de oveja. Una vez que la leche alcanzó la temperatura de 33°C, se añadió el cultivo iniciador (0,125 g/L), consistente en una mezcla de bacterias lácticas mesófilas, de adición directa a cuba (Ezal, capacidad 50 U, Texel, Dangé Saint-Romain, Francia). Después de 30 minutos en agitación se adicionó cloruro cálcico (0,05 g/L). A los 5 minutos se añadió el cuajo comercial (0,1 g/L) (Chr. Hansen's Laboratorium A/S, Copenhague, Dinamarca), que contenía un 85% de quimosina y un 15% de pepsina bovina, dejando actuar durante 40 minutos en reposo. El corte de la cuajada se realizó con liras horizontales y verticales. La cuajada se recalentó a 35°C, agitando durante 10 minutos, procediéndose posteriormente al desuerado mediante el acoplamiento de un filtro a la cuba quesera, en la cual quedó retenida dicha cuajada.

### **2.1.2. Obtención y análisis de la $\beta$ -Lg ovina y caprina**

A partir del suero ácido y dulce de leche de oveja y de cabra se llevó a cabo la obtención de la  $\beta$ -Lg, siguiendo el método de Ebeler y col., (1990). Al suero se le añadió

ácido tricloroacético (TCA) disuelto en el mínimo volumen de agua Milli-Q<sup>®</sup>, hasta obtener una concentración final de 3,1 g de TCA en 100 mL de suero. Tras un tiempo de reposo de 20 minutos, el suero se centrifugó a  $12000 \times g$  durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró mediante papel Whatman n° 40 y se dializó frente a agua destilada durante 48 horas, empleando membranas de diálisis de tamaño de poro de 6000-8000 Da (Spectra/Por<sup>®</sup> Diálisis Tubing; Spectrum<sup>®</sup> Laboratories Inc., California, USA). La  $\beta$ -Lg aislada se liofilizó y se conservó en un desecador a temperatura ambiente.

#### **2.1.2.1. Determinación de proteína mediante el método del ácido bicinónico (BCA)**

El contenido proteico de los liofilizados de  $\beta$ -Lg ovina y caprina se determinó mediante la técnica espectrofotométrica del BCA, empleando el ensayo de diagnóstico comercial de Pierce (Rockford, USA).

Se preparó el reactivo de trabajo mezclando el reactivo A, compuesto de carbonato y bicarbonato sódico, BCA y tartrato sódico en una solución de hidróxido sódico 0,1 M, con el reactivo B, compuesto de sulfato cúprico al 4%, en una proporción de 50:1, respectivamente. A 2 mL del reactivo de trabajo se añadieron 100  $\mu$ L de la solución de muestra, incubando a 60°C durante 30 minutos. Tras su enfriamiento a temperatura ambiente, la absorbancia se determinó a 562 nm en el equipo UV-120-01 (Shimadzu, Kyoto, Japón), tomando como referencia un blanco con agua destilada.

Para la curva de calibrado se prepararon concentraciones de BSA de 0,0625; 0,125; 0,25 y 0,5 mg/mL y se analizaron de acuerdo a la metodología anteriormente detallada.

#### **2.1.2.2. Cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC)**

El análisis de los liofilizados de  $\beta$ -Lg ovina y caprina se llevó a cabo mediante un método de RP-HPLC puesto a punto en el laboratorio.

El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos formado por un inyector automático modelo 717 plus (Waters corp., Mildford, USA), dos bombas modelo 116 y un

detector Diodo-Array, modelo 168 (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, USA). El procesamiento de datos se realizó con el programa SystemGold (versión 7.11, Beckman).

Las muestras de  $\beta$ -Lg se prepararon a una concentración de 5 mg/mL en agua destilada y se filtraron a través de filtros de 0,45  $\mu$ m (PVDF Durapore, Millipore corp., Bedford, USA). Se inyectaron 50  $\mu$ L de las muestras en una columna Nova-Pack C<sub>18</sub>, 60 Å, 4  $\mu$ m, con unas dimensiones de 3,9  $\times$  150 mm (Waters) y una guardacolumna C<sub>18</sub> (Waters). Para la elución se utilizó un gradiente de dos solventes A y B, constituidos por una mezcla de agua:acetonitrilo:ácido trifluoroacético (TFA) en las proporciones 950:50:1 y 100:900:1, respectivamente. El gradiente fue lineal del 0 al 50% del solvente B en 60 minutos. El flujo fue de 0,8 mL/min y la temperatura de 30°C. Antes de cada inyección la columna se acondicionó con el solvente A durante 20 minutos, al mismo flujo empleado en la separación. La detección se llevó a cabo empleando las longitudes de onda de 214 y 280 nm.

### **2.1.2.3. Isoelectroenfoque (IEF)**

Las  $\beta$ -Lg ovina y caprina obtenidas fueron analizadas mediante IEF, empleando el método de Molina (1997), en el equipo automatizado de separación y tinción PhastSystem (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Se emplearon geles PhastGel<sup>TM</sup> 3-9 (Pharmacia) y un patrón de puntos isoelectrónicos constituido por una mezcla de proteínas, aminoglucosidasa (pI 3,50), rojo de metilo (pI 3,75), inhibidor de tripsina de soja (pI 4,55),  $\beta$ -Lg A (pI 5,20), anhidrasa carbónica B bovina (pI 5,85), anhidrasa carbónica B (pI 6,55), mioglobina ácida de caballo (pI 6,85), mioglobina básica de caballo (pI 7,35), lectina ácida (pI 8,15), lectina media (pI 8,45), lectina básica (pI 8,65) y tripsinógeno (pI 9,30).

Se aplicó automáticamente con el peine 1  $\mu$ L de cada muestra, constituida por las  $\beta$ -Lg ovina y caprina de concentración 5 y 10 mg/mL en agua bidestilada, sobre el extremo anódico del gel. La separación se realizó de acuerdo con la nota técnica de separación N° 100 del manual del equipo (Pharmacia, 1984). La tinción del gel se realizó en el mismo equipo de acuerdo al método descrito en la nota de aplicación N° 200 (Pharmacia, 1986), empleando el azul de Coomassie R-350 como colorante. Tras la tinción, los geles se secaron al aire a temperatura ambiente.

#### **2.1.2.4. Electroforesis capilar (EC)**

Las  $\beta$ -Lg ovina y caprina obtenidas se analizaron mediante EC, empleando el método de Recio y Olieman (1996).

Las muestras de  $\beta$ -Lg ovina y caprina se disolvieron en agua destilada hasta una concentración de 18 mg/mL. 300  $\mu$ L de cada muestra se redisolvió en 700  $\mu$ L de tampón de la muestra. El tampón de muestra estaba constituido por una disolución 167 mM de Tris (hidroximetil) aminometano, 67 mM de ácido etilendiaminotetracético (EDTA), 42 mM de ácido 3-morfolinopropanosulfónico (MOPS) y 17 mM de DL-ditiotreitol (DTT) (Sigma Chemical, St. Louis, USA) en urea 6 M, de pH 8,6. La disolución de urea se había preparado con 0,05% (p/v) de metilhidroxietilcelulosa (MHEC) y 2,5% (p/v) de resina desionizante (lecho de mezcla de intercambio catiónico e iónico), agitando hasta alcanzar una conductividad menor de 2  $\mu$ S/cm.

El análisis fue realizado en un equipo Beckman P/ACE MDQ controlado por un software propio (Beckman). Se utilizó un capilar de sílice con un recubrimiento hidrofílico neutro CElect P1 (Supelco, Bellefonte, USA) de dimensiones 60 cm  $\times$  50  $\mu$ m de diámetro interno. Las separaciones se llevaron a cabo a 45°C, con un gradiente lineal de voltaje de 0 a 25 kV en 3 minutos, seguido de voltaje constante a 25 kV. El tampón de separación, de pH 3,0, estaba constituido por citrato trisódico dihidratado (Sigma) 20 mM y ácido cítrico (Sigma) 0,32 M disueltos en urea 6 M, preparada de la misma manera que para el tampón de muestra. La detección se realizó en el extremo catódico a 214 nm. Antes de cada separación, el capilar se lavó con tampón de separación en sentido inverso (del cátodo al ánodo) durante 6 minutos.

#### **2.1.3. Hidrólisis de la $\beta$ -Lg ovina y caprina**

La hidrólisis de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina se llevó a cabo siguiendo el método de Abubakar y col., (1998). Se emplearon cuatro enzimas proteolíticas, dos de origen digestivo y dos de origen microbiano. La tripsina (EC 3.4.21.4, Tipo-I, 10900 UI/mg de proteína) y la quimotripsina (EC 3.4.21.1, Tipo I-S, 44 UI/mg de proteína), procedían de páncreas bovino y fueron adquiridas a Sigma. La proteinasa K (EC 3.4.21.14) procedente

del *Tritirachium album* y la termolisina (EC 3.4.24.4) procedente del *Bacillus thermoproteolyticus* fueron adquiridas a Boehringer Mannheim GmbH (Manheim, Alemania).

La tripsina y la termolisina se disolvieron en un tampón Tris-HCl 0,02 N con cloruro cálcico 0,01 M, de pH 8,0. La proteinasa K se disolvió en un tampón Tris-HCl 0,02 N, de pH 7,5 y la quimotripsina en el tampón acetato amónico 0,02 M, de pH 8,0.

La  $\beta$ -Lg ovina y caprina se disolvieron a una concentración de 5 mg/mL en el tampón correspondiente según la enzima utilizada en la hidrólisis. Las condiciones de hidrólisis se detallan en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Condiciones de hidrólisis de la  $\beta$ -lactoglobulina ovina y caprina

Enzima	Tampón	pH	E/S (p/p)	Temperatura
Tripsina	Tris-HCl 0,02 N - CaCl <sub>2</sub> 0,01 M	8,0	5/100	37°C
Quimotripsina	CH <sub>3</sub> -COONH <sub>4</sub> 0,02M	8,0	5/100	25°C
Proteinasa K	Tris-HCl 0,02 N	7,5	5/100	37°C
Termolisina	Tris-HCl 0,02 N - CaCl <sub>2</sub> 0,01 M	8,0	5/100	37°C

La hidrólisis tuvo lugar durante 48 horas a 37°C con la tripsina, proteinasa K y termolisina y a 25°C con la quimotripsina. Se tomaron muestras de los hidrolizados al inicio de la reacción y a los 30 minutos, 2, 8, 24, 36 y 48 horas. La inactivación de las enzimas se llevó a cabo tras calentar las muestras a 95°C durante 15 minutos y congelar posteriormente a -20°C.

#### 2.1.4. Determinación de la actividad inhibitoria de la ACE

La actividad inhibitoria de la ACE se determinó mediante el método espectrofotométrico de Cushman y Cheung (1971), modificado por Kim y col., (1999).

De manera análoga a la forma de acción de la ACE sobre la angiotensina I, liberando la angiotensina II y el dipéptido His-Leu, la enzima actúa sobre el sustrato de reacción empleado en el método, hipuril-histidil-leucina (HHL) (Sigma), liberando el ácido

hipúrico y el dipéptido His-Leu. El método se basa en la medida espectrofotométrica a 228 nm de la absorbancia del ácido hipúrico liberado en la reacción. La medida se llevó a cabo en el espectrofotómetro DU<sup>®</sup>-70 (Beckman).

A 100 µL de la solución de sustrato, constituido por HHL a una concentración de 5 mM, disuelto en un tampón fosfato potásico 0,1 M y cloruro sódico 0,3 M, de pH 8,3, se le añadieron 20 µL de agua o de la muestra. Se añadieron 5 mU de ACE (EC 3.4.15.1; 5,1 UI/mg) (Sigma) disuelta en glicerol al 50%, incubando a 37°C durante 30 minutos. La enzima se inactivó por descenso del pH, adicionando 100 µL de ácido clorhídrico 1 N. El ácido hipúrico formado en la reacción se extrajo mediante agitación vigorosa durante 10 segundos, tras añadir 600 µL de acetato de etilo. Se centrifugó a 4000 × g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se tomaron 500 µL de la fase orgánica. La eliminación del acetato de etilo se llevó a cabo por calentamiento a 95°C durante 10 minutos. El residuo de ácido hipúrico se redisolvió en 1 mL de agua destilada y tras agitar, se midió la absorbancia a 228 nm en el espectrofotómetro. Se llevó a cabo un blanco de reacción, añadiendo el ácido clorhídrico previo a la adición de la ACE. La actividad de cada muestra se determinó por triplicado.

El porcentaje de inhibición de la ACE (% IACE) se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ IACE} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}}}$$

$A_{\text{control}}$ : Absorbancia del ácido hipúrico formado tras la acción de la ACE sin inhibidor

$A_{\text{blanco}}$ : Absorbancia del HHL que no ha reaccionado y que ha sido extraído con el acetato de etilo

$A_{\text{muestra}}$ : Absorbancia del ácido hipúrico formado tras la acción de la ACE en presencia de sustancias inhibidoras.

Se prepararon soluciones de β-Lg ovina y caprina de concentración 3 mg/mL. 20 µL de estas soluciones se añadieron al medio de reacción, determinando la actividad inhibitoria de la ACE siguiendo la metodología detallada.

A partir de los hidrolizados de las  $\beta$ -Lg ovina y caprina por la tripsina, quimotripsina, proteinasa K y termolisina a los distintos tiempos de hidrólisis se prepararon soluciones de concentración proteica decreciente, a las que se determinó la actividad inhibitoria de la ACE. Esta actividad se expresó como  $IC_{50}$  o concentración proteica necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la ACE.

Se determinó la actividad inhibitoria de la ACE en soluciones de los aminoácidos Asp, Cys, Glu, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Tyr y Val (Sigma) y de los dipéptidos Gly-Phe, Phe-Gly, Gly-Trp, Trp-Gly, Phe-Phe, Phe-Tyr, Tyr-Tyr y Lys-Phe (Sigma), de concentración 2 mg/mL.

### **2.1.5. Aislamiento y caracterización de péptidos inhibidores de la ACE del hidrolizado de la $\beta$ -Lg caprina por la termolisina**

#### **2.1.5.1. Aislamiento de péptidos mediante RP-HPLC**

El aislamiento y la purificación de péptidos a partir del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg caprina por la termolisina a las 24 horas de incubación se llevó a cabo mediante RP-HPLC, empleando el equipo cromatográfico descrito en el apartado 2.1.2.2.

La muestra, de concentración aproximada de 2-3 mg/mL, se filtró a través de filtros de 0,45  $\mu$ m (Millipore). Se inyectaron 200  $\mu$ L de la muestra en la columna Prep Nova-Pack HR C<sub>18</sub>, 60 Å, 4  $\mu$ m de dimensiones 7,8  $\times$  300 mm (Waters). Los solventes A y B fueron mezclas de agua:TFA (1000:1) y acetonitrilo:TFA (1000:1), respectivamente. Los péptidos eluyeron con un gradiente lineal del solvente B en A del 0 a 50% en 50 minutos a un flujo de 1,5 mL/minuto. La absorbancia se monitorizó a 220 y 280 nm. Las fracciones recogidas se purificaron mediante un nuevo paso cromatográfico, empleando el mismo equipo y las mismas condiciones, pero usando un gradiente lineal del 0 al 20% del solvente B en 45 minutos. Las fracciones recogidas se liofilizaron para su posterior caracterización.



### **2.1.5.2. Caracterización del hidrolizado mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-ESI-MS)**

La caracterización del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg caprina por la termolisina a las 24 horas de incubación se llevó a cabo mediante HPLC-ESI-MS, en un equipo HP serie 1100 MSD (Hewlett Packard, Palo Alto, USA).

Se inyectaron 20  $\mu$ L del hidrolizado en una columna Hi-Pore RP-318, de dimensiones 250  $\times$  4,6 mm (Bio-Rad). Las fases móviles A y B empleadas fueron mezclas de agua:ácido acético (1%) y acetonitrilo:ácido acético (1%), respectivamente. Se empleó un gradiente lineal del 0 al 50% del solvente B en 50 minutos. El flujo empleado fue de 0,7 mL/minuto.

El análisis de las masas se realizó mediante espectrometría de masas (MS) en un equipo de simple cuadrupolo. El voltaje capilar se mantuvo a 4000 V, la presión del nebulizador a 40 psi y la temperatura y flujo del gas de secado fueron de 320°C y 10 L/minuto, respectivamente. Se empleó el fragmentador de 40 V. El intervalo de adquisición (m/z) fue de 100-2000 uma. La adquisición y el análisis de los datos se realizó mediante el programa HPChem Stations (versión A.07.01; Hewlett Packard).

### **2.1.5.3. Identificación de péptidos mediante ESI-MS y secuenciación de aminoácidos**

El análisis de las masas moleculares de las fracciones aisladas y purificadas se llevó a cabo mediante MS, empleando el mismo equipo y las condiciones detalladas en el apartado 2.1.5.2. Las muestras se disolvieron en una concentración aproximada de 10  $\mu$ g/mL en una mezcla de agua:acetonitrilo al 50% (v/v) y ácido acético (1%) (v/v). Se inyectaron 10  $\mu$ L de la muestra empleando un flujo de 0,5 mL/minuto de la mezcla agua:acetonitrilo (50:50) con ácido acético 1% a través del electrospray.

El análisis de la secuencia N-terminal de los péptidos se llevó a cabo en el Servicio de Análisis de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Se empleó el método automatizado de degradación de Edman de manera de pulso líquido, en un

microprocesador Perkin-Elmer/Applied Biosystems Procise 494 (PerkinElmer<sup>™</sup> Analytical Instruments, Shelton, USA).

#### **2.1.5.4. Síntesis de péptidos inhibidores de la ACE**

La síntesis de péptidos se realizó en el Servicio de Síntesis de Péptidos de la Universidad Autónoma de Barcelona, mediante el método convencional Fmoc en fase sólida empleando un sintetizador de péptidos 431A (Applied Biosystem Inc., Überling, Alemania).

## **2.2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA $\beta$ -LG BOVINA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES**

### **2.2.1. Hidrólisis de $\beta$ -Lg A bovina en condiciones desnaturalizantes**

Se llevó a cabo la hidrólisis de  $\beta$ -Lg A bovina (Sigma) por la termolisina (Boehringer Mannheim, GmbH) en condiciones térmicas desnaturalizantes. Para ello, se preparó una solución de  $\beta$ -Lg A de concentración 2 mg/mL en un tampón Tris-HCl 0,02 M con cloruro cálcico 0,01 M, de pH 8,0. La termolisina se disolvió en el mismo tampón y se añadió a la solución de proteína hasta obtener una relación enzima/sustrato del 5% (p/p). La hidrólisis tuvo lugar a 37°C, 50°C, 60°C y 80°C, durante 4 horas en un baño de agua. Se tomaron alícuotas de cada uno de los hidrolizados a los 30 minutos y 2 horas de hidrólisis y al final de la reacción. La enzima se inactivó por la adición de 50  $\mu$ L de EDTA alcanzándose una concentración final en el medio de 0,2 M.

### **2.2.2. Análisis de los hidrolizados mediante RP-HPLC y HPLC-ESI-MS**

El análisis de los hidrolizados de  $\beta$ -Lg A bovina por la termolisina a las distintas temperaturas y tiempos de incubación se llevó a cabo mediante RP-HPLC, empleando el mismo equipo cromatográfico descrito en el apartado 2.1.2.2. Las muestras, con una concentración de 2 mg/mL, se filtraron a través de filtros de 0,45  $\mu$ m (Millipore). Se inyectaron 50  $\mu$ L de la muestra en la columna Hi-Pore RP-318, de dimensiones 250  $\times$  4,6 mm (Bio-Rad). Las fases móviles A y B fueron mezclas de agua:TFA (0,1%) y acetonitrilo:TFA (0,1%), respectivamente. El flujo fue de 1 mL/minuto. El gradiente fue lineal del 0 al 50% del solvente B en 60 minutos. La detección se llevó a cabo a 214 y 280 nm.

La caracterización de los hidrolizados de  $\beta$ -Lg bovina A se llevó a cabo mediante HPLC-ESI-MS, empleando el mismo equipo y las mismas condiciones (columna, solventes y flujo) descritas en el apartado 2.1.5.2. El gradiente fue lineal del 10 al 45% del solvente B en 42 minutos. Previa a la inyección, la columna se equilibró con el solvente B (10%) durante 20 minutos.

### **2.2.3. Aislamiento y caracterización de las fracciones peptídicas mediante RP-HPLC y ESI-MS**

Las fracciones peptídicas se aislaron a partir del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg A bovina por la acción de la termolisina tras 2 horas de incubación a 50°C, mediante RP-HPLC. El equipo fue el mismo que el descrito en el apartado 2.1.2.2. Se inyectaron 50  $\mu$ L del hidrolizado en la columna Hi-Pore RP-318, de dimensiones 250  $\times$  4,6 mm (Bio-Rad). Las fases móviles A y B fueron mezclas de agua:ácido acético (1%) y acetonitrilo:ácido acético (1%), respectivamente. El flujo fue de 0,7 mL/minuto. El gradiente fue lineal del 10 al 35% del solvente B en 50 minutos. La absorbancia se monitorizó a 214 y 280 nm.

Para llevar a cabo la identificación de los péptidos, las fracciones peptídicas recogidas se liofilizaron, se disolvieron en un volumen menor de agua destilada y se analizaron mediante ESI-MS, empleando la metodología detallada en el apartado 2.1.5.3. El volumen de muestra fue de 50  $\mu$ L.

## **2.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ACE EN PRODUCTOS LÁCTEOS COMERCIALES**

### **2.3.1. Productos lácteos comerciales**

Se adquirieron dos muestras de leche de vaca desnatadas comerciales, una de ellas pasteurizada y otra esterilizada por tratamiento UHT.

Se adquirieron quince productos lácteos comerciales, de distinto origen y composición. Trece de ellos se habían elaborado con leche de vaca y dos a partir de leche de cabra. En la Tabla 8 se detalla el tipo y la composición de los productos adquiridos.

Se adquirieron once leches maternizadas comerciales, ocho de ellas de iniciación, dos de continuación y una mixta, empleada para lactantes y niños con alergia a las proteínas. Todos los productos contenían proteínas lácteas, excepto uno de ellos que contenía proteínas de soja. Dos de los productos adquiridos estaban compuestos por proteínas lácteas hidrolizadas. En la Tabla 9 se detalla el tipo y la composición de cada una de estas leches maternizadas. Estos productos se reconstituyeron con agua destilada, en la misma proporción a la administrada a los lactantes (aproximadamente 4,5 g de leche en polvo en 30 mL de agua).

Además, se adquirieron del comercio dos quesos frescos y dos derivados de quesos frescos, denominados mousses. En la Tabla 10 se detalla el tipo y la composición de cada uno de estos productos lácteos comerciales.

### **2.3.2. Obtención del extracto soluble en agua**

El extracto soluble en agua se obtuvo a partir de los productos lácteos comerciales, siguiendo el método de Rokka y col., (1997). Se centrifugaron los productos lácteos a  $12000 \times g$  durante 20 minutos a  $5^{\circ}\text{C}$  y se filtraron mediante papel Whatman n° 40. El pH de las leches maternizadas se ajustó a 4,6, previamente a la centrifugación.

**Tabla 8.** *Composición de los productos lácteos fermentados comerciales (LF)*

<b>Nº muestra</b>	<b>Tipo de producto</b>	<b>Composición</b>
LF-1	Yogur	Leche parcialmente desnatada, leche en polvo desnatada, proteínas lácteas y fermentos lácticos
LF-2	Yogur	Leche, azúcares, fermentos lácticos, nata y proteínas lácteas
LF-3	Yogur desnatado	Leche desnatada, leche en polvo desnatada, proteínas lácteas, fermentos lácticos y edulcorantes
LF-4	Yogur desnatado	Leche desnatada, fermentos lácticos, proteínas lácteas y gelatina
LF-5	Leche fermentada	Leche parcialmente desnatada, azúcares, fermentos lácticos y <i>Lb. casei</i>
LF-6	Leche fermentada	Leche, azúcares, proteínas lácteas, leche en polvo desnatada, proteínas lácteas y fermentos lácticos
LF-7	Leche fermentada	Leche, leche en polvo desnatada, fermentos lácticos ( <i>Lb. johnsonii</i> ) y gelatina
LF-8	Yogur líquido	Leche desnatada, azúcares, leche en polvo desnatada y fermentos lácticos
LF-9	Yogur Bio	Leche, leche en polvo desnatada, nata, proteínas lácteas, bifidobacterias y otros fermentos lácticos
LF-10	Yogur griego	Leche, nata, leche en polvo desnatada, proteínas lácteas y fermentos lácticos
LF-11	Crema de yogur	Leche, leche desnatada concentrada, azúcares, nata y fermentos lácticos
LF-12	Mousse yogur	Leche, nata, azúcares, leche en polvo desnatada, grasa vegetal, gelatina, emulsionante y fermentos lácticos
LF-13	Cuajada	Leche, nata, leche en polvo desnatada, gelatina, estabilizante y cuajo
LF-14	Kefir cabra	Leche de cabra pasteurizada y fermentos lácticos del kefir con <i>Lb. casei</i>
LF-15	Yogur cabra	Leche pasteurizada de cabra y fermentos lácticos

**Tabla 9.** *Composición de las leches maternizadas comerciales (LM)*

<b>Nº muestra</b>	<b>Tipo de producto</b>	<b>Composición</b>
LM-1	De iniciación	Seroproteína concentrada
LM-2	De iniciación y continuación	Caseínas hidrolizadas enzimáticamente
LM-3	De iniciación	Suero lácteo desmineralizado y proteínas de leche
LM-4	De continuación. Probiótica	Leche desnatada y fermentos lácticos
LM-5	De iniciación	Proteínas aisladas de soja
LM-6	De iniciación	Suero lácteo desmineralizado en polvo y leche desnatada en polvo
LM-7	De continuación	Seroproteínas hidrolizadas
LM-8	De iniciación	Suero lácteo desmineralizado
LM-9	De iniciación	Suero lácteo desmineralizado y leche desnatada
LM-10	De iniciación	Leche entera y concentrados de proteínas de suero lácteo desmineralizado
LM-11	De iniciación	Suero lácteo desmineralizado y leche desnatada

**Tabla 10.** *Composición de los quesos frescos (QF) y mousses de quesos frescos (M) comerciales*

<b>Nº muestra</b>	<b>Tipo de producto</b>	<b>Composición</b>
QF-1	Queso fresco	Leche pasteurizada de vaca, sal y cuajo
QF-2	Queso fresco Bio	Leche, sal, conservador, cuajo y fermentos lácticos ( <i>Lb. reuteri</i> )
M-1	Mousse de queso fresco	Queso fresco desnatado (56,1%), leche desnatada, nata, azúcar (6,8%), leche en polvo desnatada, almidón modificado, proteínas de leche, gelatina, estabilizante y fermentos lácticos
M-2	Mousse de queso fresco	Queso fresco desnatado (52%), leche desnatada, nata, azúcar, fermentos lácticos, gelatina, proteínas de leche, almidón modificado y dextrosa



### **2.3.3. Determinación del nitrógeno total y del nitrógeno amínico**

El contenido de nitrógeno total del extracto soluble en agua de los productos lácteos comerciales se determinó mediante el método Kjeldahl, según la norma IDF Estándar 20B (IDF, 1993). Se empleó un sistema de digestión Tecator y una analizador Kjeltec auto 1030, ambos adquiridos a Foss Electric S/A (Hillerod, Dinamarca). Tras una primera digestión con ácido sulfúrico concentrado a ebullición en presencia de sulfato potásico y sulfato de cobre como catalizadores y la posterior destilación por arrastre de vapor en medio alcalino, se recogió el destilado sobre una solución de ácido bórico empleando como indicador el rojo de metilo. El amoníaco recogido se valoró con ácido clorhídrico 0,1 N.

El nitrógeno amínico se determinó mediante el método de la ninhidrina-cadmio, de acuerdo con el protocolo de Doi y col., (1981). Para ello, a 1 mL de muestra, se le añadieron 2 mL del reactivo de trabajo, compuesto por ninhidrina y cloruro de cadmio, disueltos en etanol y ácido acético. Tras la incubación a 84°C durante 5 minutos, la reacción se paró por inmersión en baño de hielo. La absorbancia se determinó a 507 nm en un equipo UV-120-01 (Shimadzu). Los análisis se llevaron a cabo por duplicado.

Se empleó como patrón estándar una solución del aminoácido Leu. Para ello, se prepararon soluciones de este aminoácido de concentración 13, 26, 32,5, 39 y 45,5 mg/L y se analizaron siguiendo la metodología anteriormente detallada. El nitrógeno amínico se calculó a partir del valor de concentración de Leu dividido entre el peso molecular de la Leu (131,18) y multiplicado por el peso molecular del nitrógeno (14).

### **2.3.4. Determinación de la actividad inhibitoria de la ACE**

La actividad inhibitoria de la ACE se determinó en el extracto soluble en agua de los productos lácteos comerciales, siguiendo la metodología detallada en el apartado 2.1.4.

### **2.3.5. Análisis del extracto soluble en agua mediante RP-HPLC**

El análisis del extracto soluble en agua de los productos lácteos comerciales se llevó a cabo mediante RP-HPLC, empleando el mismo equipo descrito en el apartado

2.1.2.2. Se inyectaron 60  $\mu$ L de muestra en la columna Hi-Pore RP-318, de dimensiones 250  $\times$  4,6 mm (Bio-Rad). Los solventes A y B estaban constituidos por mezclas de agua:TFA (0,1%) y acetonitrilo:TFA (0,1%), respectivamente. El gradiente fue lineal del 2 al 50% del solvente B en 60 minutos y el flujo de 0,8 mL/minuto. La absorbancia se monitorizó a 214 y 280 nm.

Se emplearon soluciones de concentración 3 mg/mL de las proteínas del suero,  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg y BSA bovina (Sigma) y una solución al 0,5% (p/v) de CMP bovino. El CMP se obtuvo mediante la hidrólisis con quimosina de la  $\kappa$ -CN (Sigma). Tras el aislamiento por la precipitación de la para- $\kappa$ -CN a pH 4,6, el CMP se disolvió al 0,5% (p/v) en el tampón Tris-HCl, de pH 8,0. 60  $\mu$ L de estas soluciones se inyectaron empleando las mismas condiciones cromatográficas.

### **2.3.6. Simulación de la digestión gastrointestinal de productos lácteos fermentados y de leches maternizadas**

Para llevar a cabo la simulación de la digestión gastrointestinal, se seleccionaron dos productos lácteos fermentados y dos leches maternizadas. Dicha simulación se llevó a cabo de acuerdo con el método de Alting y col., (1997). Para ello, se prepararon soluciones acuosas de las muestras de leche a una concentración del 0,7% de proteína (p/v). El pH de las soluciones de los productos lácteos fermentados se ajustó a 2,0 y el de las leches maternizadas a 3,5. Inicialmente, la hidrólisis se llevó a cabo con pepsina (EC 3.4.4.1; 1:60000; 3400UI/mg de proteína) (Sigma). La enzima se añadió a la solución de las muestras en una concentración de 20 mg/g de proteína de la muestra. Tras 90 minutos de incubación a 37°C, la pepsina se inactivó por elevación del pH a 7-8. Posteriormente, la Corolasa PP (polvo derivado del páncreas bovino que contiene actividad de tripsina, quimotripsina y de varias exopeptidasas) (Röhm, Darmstadt, Alemania) se añadió en una concentración de 40 mg/g de proteína de la muestra. La reacción se llevó a cabo durante 4 horas a 37°C. Las enzimas se inactivaron por calentamiento a 95°C durante 15 minutos.

Los hidrolizados obtenidos se centrifugaron a 10000  $\times$  g durante 30 minutos a temperatura ambiente, filtrando el sobrenadante obtenido. A partir de este sobrenadante se

obtuvo la fracción inferior a 3000 Da, mediante ultrafiltración, empleando membranas con este tamaño de corte (Centripep<sup>®</sup> 3; Amicon, Inc., Beverly, USA). La centrifugación se llevó a cabo a  $2500 \times g$  durante 4 horas a 15°C.

### **2.3.7. Aislamiento de péptidos inhibidores de la ACE a partir de un producto lácteo fermentado**

Se seleccionó uno de los productos lácteos fermentados comerciales para llevar a cabo el aislamiento de péptidos con actividad inhibitoria de la ACE. Para ello, la leche fermentada seleccionada se centrifugó a  $2500 \times g$  durante 10 minutos a temperatura ambiente, filtrando el extracto soluble en agua obtenido a través de papel Whatman n° 40. A partir de este extracto se obtuvieron las fracciones menores de 10000 y 3000 Da, mediante ultrafiltración, siguiendo la metodología detallada en el apartado 2.3.6. La fracción menor de 10000 Da se obtuvo empleando membranas con este tamaño de corte (Centripep<sup>®</sup> 10; Amicon).

El análisis del perfil proteico y peptídico del extracto y de las fracciones se llevó a cabo mediante RP-HPLC, empleando el mismo equipo detallado en el apartado 2.1.2.2. Se inyectaron 200  $\mu$ L de la muestra en la columna Hi-Pore RP-318, de dimensiones  $250 \times 4,6$  mm (Bio-Rad). Las fases móviles A y B estaban constituidas de mezclas de agua:TFA (1%) y acetonitrilo:TFA (0,08%), respectivamente. El gradiente fue del 1 al 20% del solvente B durante 55 minutos y del 20 al 70% del solvente B durante 10 minutos. El flujo fue de 0,8 mL/minuto.

Con el fin de eliminar los azúcares presentes en el extracto soluble en agua obtenido a partir del producto lácteo fermentado se llevó a cabo previamente una fase de extracción en fase sólida, de acuerdo con el método de Yamamoto y col., (1999). Para ello, se emplearon cartuchos C<sub>18</sub> Sep-Pak (Waters) acondicionados con 100 mL de acetonitrilo, a un flujo de 5 mL/minuto y equilibrados con agua (100 mL a un flujo de 5 mL/minuto). Tras la carga de la muestra (2 mL/minuto), se realizó una etapa previa de lavado con 100 mL de agua, a un flujo de 5 mL/minuto y posteriormente se eluyó con una mezcla de acetonitrilo:agua (70:30) a un flujo de 2 mL/minuto. Tras eliminar el acetonitrilo, el extracto obtenido se liofilizó y se congeló a -20°C. El contenido de nitrógeno y proteína se

determinó mediante microanálisis en el servicio de Microanálisis del Centro de Química Orgánica “Manuel Lora Tamayo”.

El aislamiento de fracciones peptídicas se llevó a cabo mediante RP-HPLC preparativo. Se empleó un cromatógrafo constituido por una bomba Delta 600 (Waters), un controlador de las bombas Controller 600 (Waters), un inyector automático modelo 717 plus (Waters) y un detector de fotodiodos alineados 996 (Waters), acoplado a un colector de fracciones automático Fraction colector II (Waters).

Se preparó una solución de concentración 40 mg/mL del liofilizado del extracto obtenido y se filtró a través de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore). Se inyectaron 200  $\mu\text{L}$  de la muestra en una columna Nova-Pack HR  $\text{C}_{18}$ , de dimensiones 7,8  $\times$  300 mm (Waters). La separación se llevó a cabo a una temperatura controlada de 30°C. Las fases móviles A y B fueron mezclas de agua:TFA (0,1%) y acetonitrilo:TFA (0,1%). El gradiente empleado fue lineal del 1 al 20% del solvente B en 55 minutos y del 20 al 40% en 40 minutos. El flujo fue de 4 mL/minuto.

Las fracciones más activas fueron analizadas mediante HPLC acoplada a ESI-MS. El equipo de HPLC empleado fue un HP Agilent 1100 (Agilent Technologies, Alemania), constituido por una bomba cuaternaria (Agilent Serie 1100), un detector de longitud de onda variable (Agilent Serie 1100), en combinación con un inyector automático Agilent Serie 1100 y un programa de adquisición y procesamiento de datos (ChemStation para LC 3D, Agilent Technologies).

Se inyectaron 50  $\mu\text{L}$  de la fracción en la columna Hi-Pore  $\text{C}_{18}$ , 5  $\mu\text{m}$ , de dimensiones 250  $\times$  4,6 mm (Bio-Rad Laboratories). Los solventes A y B estaban constituidos por una mezcla de agua: TFA (1000:0,37) y acetonitrilo:TFA (1000:0,27), respectivamente. Las muestras eluyeron a un flujo de 0,8 mL/min, empleando un gradiente lineal del solvente B en A del 0 al 10% en 10 minutos, del 10 al 30% en 10 minutos y del 30 al 70% en 5 minutos. La absorbancia se monitorizó a 214 nm.

El análisis de las masas se realizó mediante MS en un cuadrupolo de trampa iónica Esquire-LC (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). El flujo en el interior del nebulizador del electrospray fue de aproximadamente 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  y se empleó nitrógeno como gas nebulizador y de secado. La presión de helio se mantuvo a 60 psi. El intervalo de adquisición ( $m/z$ ) fue de 100-3000 uma. Los iones fueron escaneados a una velocidad de 13000 Da/seg.

## 2.4. PREPARACIÓN DE LECHE FERMENTADAS CON ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ACE

### 2.4.1. Bacterias lácticas

Se seleccionaron siete cepas de bacterias lácticas, seis de ellas pertenecientes al género *Lactobacillus* y una perteneciente al género *Streptococcus*. Estas cepas se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia. En la Tabla 11 se detallan las cepas de las bacterias lácticas y las condiciones de cultivo.

**Tabla 11.** Cepas de las bacterias lácticas y condiciones de cultivo

Cepa bacteriana	Nº Cepa	Medio de cultivo	Temperatura
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4645	MRS	37°C
<i>Lactobacillus helveticus</i>	402	MRS	37°C
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	287 <sup>T</sup>	MRS	37°C
<i>Lactobacillus casei</i>	475 <sup>T</sup>	MRS	37°C
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	4005 <sup>T</sup>	MRS	37°C
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	289	MRS	37°C
<i>Streptococcus thermophilus</i>	801	Infusión cerebro corazón	37°C

El liofilizado de las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* se resuspendió en 500 µL del medio de cultivo estéril Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Pronadisa, Madrid, España). El liofilizado de *Streptococcus thermophilus* se resuspendió en 500 µL del medio de cultivo estéril caldo infusión cerebro corazón (Pronadisa). Las bacterias se inocularon al 0,5% en su medio de cultivo y los tubos se incubaron a 37°C durante 24 horas. Estas suspensiones bacterianas se conservaron añadiendo glicerol estéril al medio hasta una

concentración final de glicerol del 17%, a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta los posteriores análisis.

#### **2.4.2. Curvas de crecimiento**

Las suspensiones bacterianas se inocularon al 1% en el medio de cultivo MRS o caldo infusión cerebro corazón, según la cepa bacteriana. La incubación se llevó a cabo a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24-36 horas. Se tomaron alícuotas de la suspensión a distintos tiempos de incubación, midiendo la absorbancia a 600 nm en el equipo UV-120-01 (Shimadzu).

La población de bacterias lácticas viables se determinó por recuento de colonias en placas de MRS-Agar (1,5%) o caldo infusión cerebro corazón-Agar (1,5%). El banco de diluciones se realizó en solución salina 0,9%. Las placas se sembraron en masa y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonia ufc/mL de medio de cultivo. Estos análisis también sirvieron para comprobar la pureza del cultivo.

Se tomaron fotografías de las placas con la cámara digital DC-265 (Eastman Kodak Company, New Jersey, USA), que se procesaron con el programa Adobe PhotodeLuxe Edition 1.0. La observación de las cepas bacterianas se realizó en fresco a partir de las placas de cultivo sólido utilizando microscopía óptica mediante la técnica de contraste interferencial de Nomarsky. Se empleó el microscopio Aristoplan (Wild Leitz, Suiza) al que se acopló la cámara digital DC-200 (Leica, Suiza). El procesado de las imágenes se llevó a cabo con el programa IM-500 (Leica).

#### **2.4.3. Fermentación de la leche y del concentrado de proteínas de suero**

Se adquirió del comercio una muestra de leche de vaca desnatada esterilizada por tratamiento UHT.

A partir del suero de quesería dulce de leche de oveja, se obtuvo el concentrado de proteínas de suero. Para ello, el pH del suero se ajustó a 4,6 con ácido clorhídrico 2 N y se centrifugó a  $4500 \times g$  durante 20 minutos a  $5^{\circ}\text{C}$ , filtrando el sobrenadante. El suero

obtenido fue ultrafiltrado, empleando un equipo de ultrafiltración Minitian™ (Millipore) y membranas de 10000 Da de tamaño de poro (Millipore), hasta conseguir una reducción de volumen de tres veces el volumen inicial del suero. Posteriormente, el suero se liofilizó y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se preparó una solución del liofilizado al 10% (p/v) en un tampón fosfato potásico 0,2 M de pH 8,0 y se pasteurizó por tratamiento térmico a  $85^{\circ}\text{C}$  durante 5 min.

Las suspensiones bacterianas se inocularon al 1% en el medio de cultivo adecuado para cada cepa. Tras la incubación durante 24-48 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , las suspensiones bacterianas se inocularon al 1% en la leche y en la solución del concentrado de proteínas de suero. El proceso fermentativo tuvo lugar a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 6, 24, 48 y 72 horas.

#### **2.4.4. Determinación de la actividad inhibitoria de la ACE**

La fracción peptídica de la leche y del concentrado de proteínas de suero fermentados se obtuvo siguiendo el método de Nakamura y col., (1995). El pH de los productos fermentados se ajustó a 4,0 con ácido clorhídrico 1 N. Tras la centrifugación a  $6000 \times g$  durante 10 minutos a  $5^{\circ}\text{C}$ , el sobrenadante se filtró mediante papel Whatman n° 41. Posteriormente, el pH se ajustó a 8-8,5 con hidróxido sódico 1 N y se centrifugó a  $6000 \times g$  durante 10 minutos a  $5^{\circ}\text{C}$ , filtrando el sobrenadante obtenido a través de papel Whatman n° 41.

Se determinó la actividad inhibitoria de la ACE en las fracciones peptídicas obtenidas siguiendo la metodología detallada en el apartado 2.1.4.



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

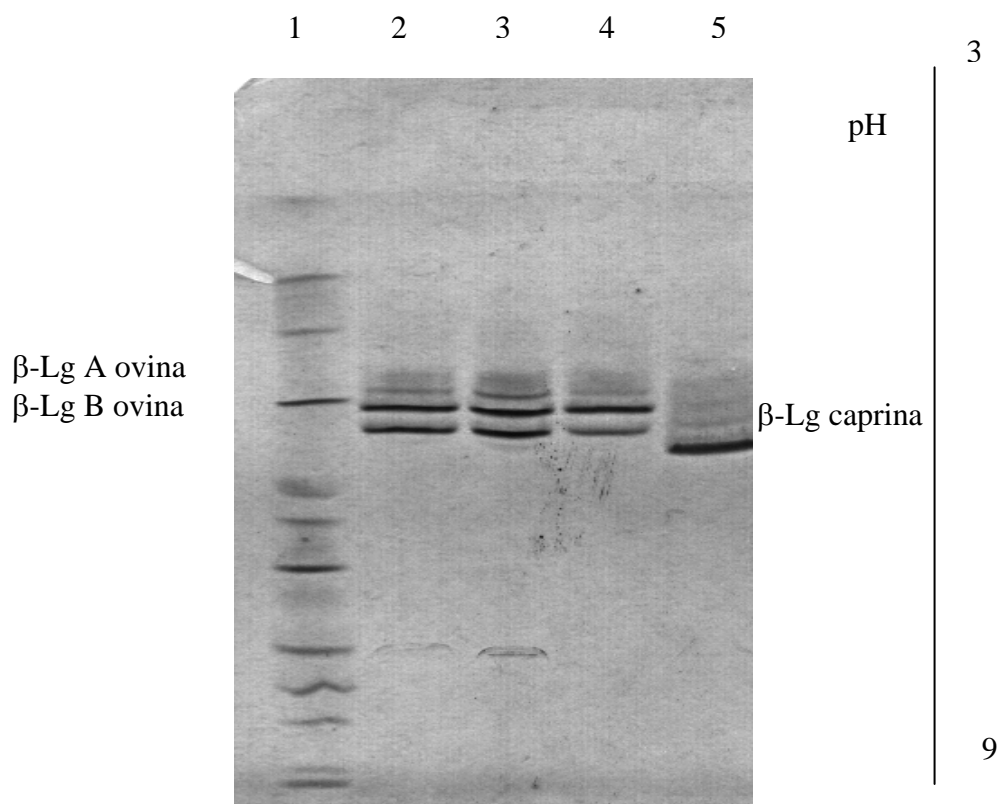
### **3.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA ACE DERIVADOS DE LA $\beta$ -LG OVINA Y CAPRINA**

En nuestro país, la elaboración de queso se realiza fundamentalmente con leche de oveja y de cabra, lo que supone la producción del suero de estas especies de forma mayoritaria. Sin embargo, hasta la actualidad se han llevado a cabo pocos estudios encaminados a la obtención de péptidos inhibidores de la ACE a partir de leche ovina y caprina. Por esta razón, nuestro estudio se ha centrado en el aislamiento y la caracterización de péptidos con actividad inhibitoria de la ACE procedentes de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina, obtenida a partir de suero de quesería ácido y dulce.

#### **3.1.1. Obtención y análisis de la $\beta$ -Lg ovina y caprina**

El contenido proteico de los liofilizados de la  $\beta$ -Lg, obtenida a partir de suero ácido y dulce de leche de oveja y de suero ácido de leche de cabra (apartado 2.1.2) se determinó mediante el método del BCA, descrito en el apartado 2.1.2.1. Los valores obtenidos fueron del 77,0 y del 75,6% para los liofilizados de  $\beta$ -Lg ovina procedente de suero ácido y dulce, respectivamente y del 72,4% para el liofilizado de  $\beta$ -Lg caprina.

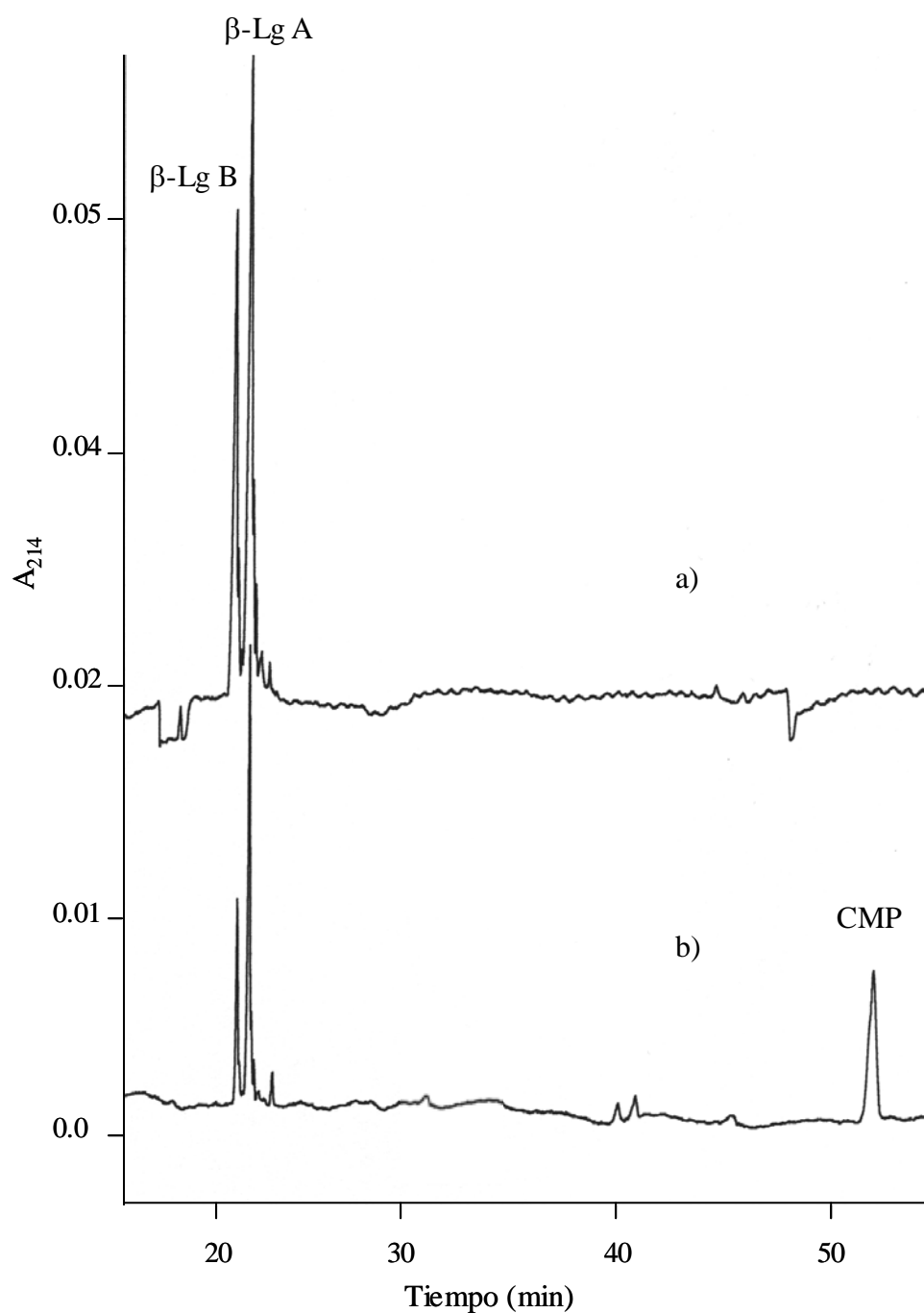
El análisis de las preparaciones de  $\beta$ -Lg se realizó mediante IEF, EC y RP-HPLC. En la Figura 3 se muestra el perfil electroforético de la  $\beta$ -Lg obtenido mediante IEF, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.1.2.3. La preparación de la  $\beta$ -Lg ovina obtenida a partir de suero ácido (calles 2 y 3) se resolvió en dos bandas con puntos isoeléctricos de 5,27 y 5,44, que correspondieron a las variantes genéticas A y B, respectivamente (Bell y McKenzie, 1967). La  $\beta$ -Lg obtenida a partir de suero dulce de leche de oveja también mostró estas dos bandas (calle 4), siendo más intensa la banda correspondiente a la variante A con respecto a la correspondiente a la variante B. La preparación de la  $\beta$ -Lg caprina obtenida a partir de suero ácido se resolvió en una única banda, con un punto isoeléctrico de 6,03 (calle 5), correspondiente a la única variante genética descrita para esta proteína (Ng-Kwai-Hang y Grosclaude, 1992).



**Figura 3.** Electroforegrama obtenido mediante IEF de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina. Calle 1, Kit de puntos isoeléctricos. Calle 2,  $\beta$ -Lg ovina de suero ácido (5 mg/mL). Calle 3,  $\beta$ -Lg ovina de suero ácido (10 mg/mL). Calle 4,  $\beta$ -Lg ovina de suero dulce (5 mg/mL). Calle 5,  $\beta$ -Lg caprina de suero ácido (5 mg/mL)

Al analizar la  $\beta$ -Lg ovina y caprina mediante EC, siguiendo el método descrito en el apartado 2.1.2.4., se obtuvieron resultados similares (Figura 4). Se observaron las dos variantes genéticas A y B de la  $\beta$ -Lg obtenida a partir de suero ovino, con un mayor enriquecimiento de la variante A sobre la variante B en la  $\beta$ -Lg obtenida a partir de suero dulce. El CMP fue observado en el electroforegrama correspondiente a la  $\beta$ -Lg ovina obtenida a partir de suero dulce, no habiéndose detectado en el gel de IEF debido a su baja capacidad de fijación del colorante Coomassie Blue.

El análisis de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina también se llevó a cabo mediante RP-HPLC, siguiendo el método descrito en el apartado 2.1.2.2., obteniéndose resultados análogos a los obtenidos por las técnicas electroforéticas. El pico correspondiente a la  $\beta$ -Lg presentó un tiempo de retención de 60 minutos. La pureza de los preparados de  $\beta$ -Lg, expresada como porcentaje del área total del cromatograma, fue del 99,9 y del 92,9%, para la  $\beta$ -Lg obtenida a partir de suero ácido ovino y caprino, respectivamente. La pureza de la preparación de la  $\beta$ -Lg ovina procedente de suero dulce fue del 72,6%, observándose el mayor enriquecimiento de la variante A sobre la B y la presencia del CMP.



**Figura 4.** Electroforegramas de a)  $\beta$ -Lg ovina de suero ácido y b)  $\beta$ -Lg ovina de suero dulce, obtenidos mediante EC

### **3.1.2. Hidrólisis de la $\beta$ -Lg ovina y caprina. Análisis de los hidrolizados mediante RP-HPLC**

La hidrólisis de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina se llevó a cabo mediante dos enzimas de origen digestivo, tripsina y quimotripsina, y dos enzimas de origen microbiano, proteinasa K y termolisina, siguiendo el método descrito en el apartado 2.1.3. La incubación tuvo lugar durante 48 horas, tomándose muestras a los 30 minutos, 2, 8, 24, 36 y 48 horas. La inactivación de las enzimas en cada una de las muestras se consiguió mediante tratamiento térmico.

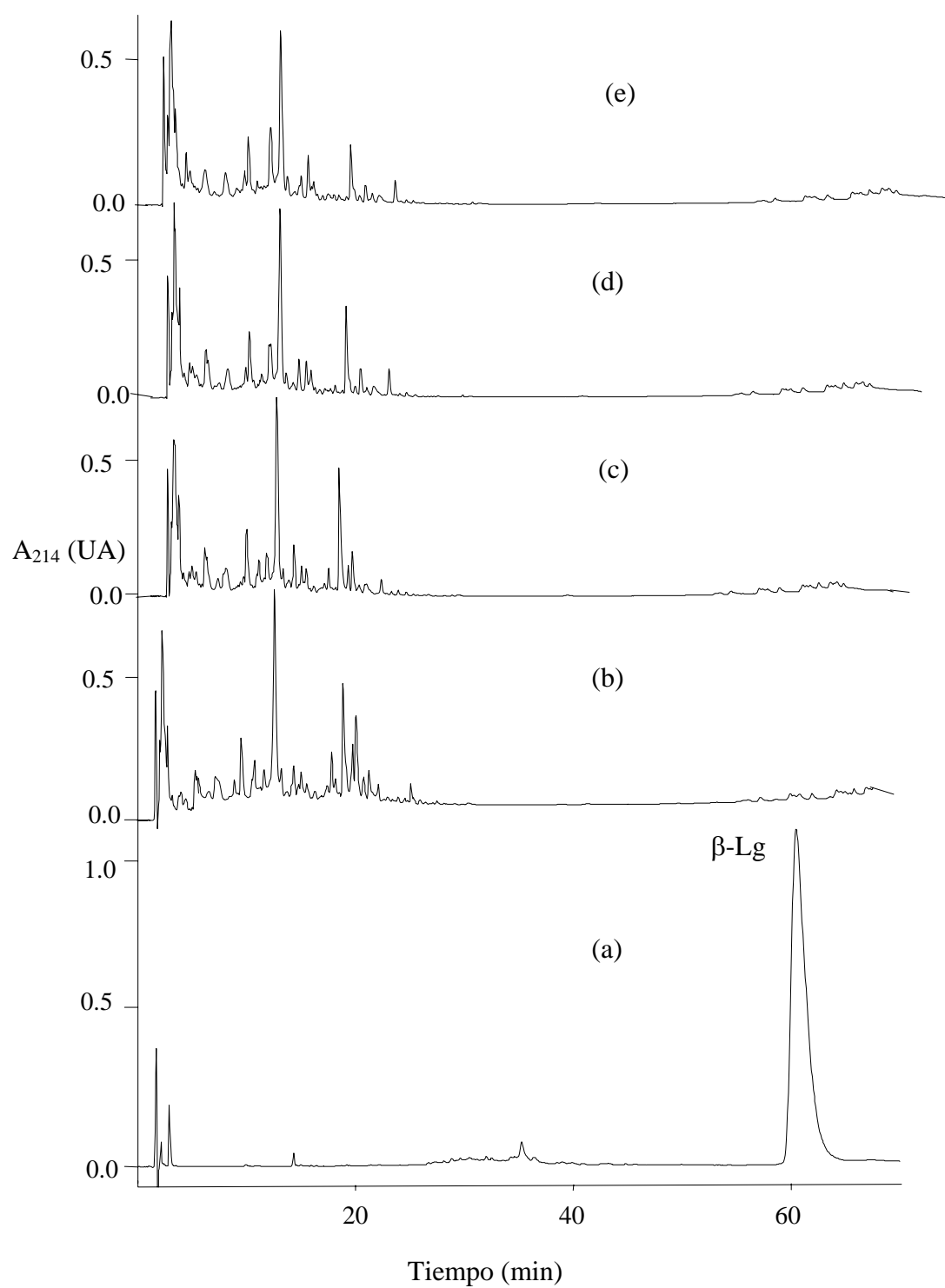
La evolución de la hidrólisis se monitorizó mediante RP-HPLC, empleando el método descrito en el apartado 2.1.2.2. La  $\beta$ -Lg intacta apareció al final del cromatograma, con un tiempo de retención de 60 minutos. Tras la hidrólisis, los péptidos liberados aparecieron con tiempos de retención en el intervalo entre 0 y 45 minutos, variable en función de la enzima proteolítica responsable de la hidrólisis y del tiempo de incubación.

La acción de la tripsina sobre la  $\beta$ -Lg provocó la disminución del área del pico de la proteína tras los primeros 30 minutos de incubación, desapareciendo totalmente a las 2 horas. Dalgarrondo y col., (1990) habían descrito la permanencia de un 21% de la  $\beta$ -Lg bovina intacta tras 2 horas de hidrólisis. Estos autores emplearon un tampón Tris-HCl 0,1 M a pH 8,0 y una relación E/S del 1%. La adición de calcio a una concentración de 0,01 M en nuestro tampón de reacción pudo favorecer el incremento de la velocidad de acción de la tripsina sobre la  $\beta$ -Lg, ya que se ha comprobado que la unión del calcio a la enzima provoca un cambio conformacional en la misma, lo que favorece la acción sobre el sustrato (Baumy y Brulé, 1988). Durante las primeras horas de hidrólisis se liberaron fragmentos de mayor hidrofobicidad, que tras una incubación más prolongada se hidrolizaron dando lugar a fragmentos más hidrofílicos, con tiempos de retención inferiores. De manera similar, en el cromatograma del hidrolizado trípico de la  $\beta$ -Lg bovina en los primeros minutos de incubación, Dalgarrondo y col., (1990) habían observado dos picos, uno de ellos correspondiente al fragmento f(15-40) y otro correspondiente al fragmento constituido por los péptidos f(41-69) + f(149-162), unidos entre sí por el puente disulfuro Cys<sub>66</sub>-Cys<sub>160</sub>. Estos dos picos desaparecieron totalmente tras dos horas de incubación, debido a la ruptura de los péptidos y la consecuente formación de péptidos de menor tamaño.

La quimotripsina actuó de manera más gradual sobre la  $\beta$ -Lg, por lo que fueron necesarias 24 horas de incubación para la desaparición total de la proteína. Reddy y col., (1988) habían descrito como factores determinantes en la resistencia de la  $\beta$ -Lg a la acción de la quimotripsina, tanto la estructura como la estabilidad conformacional de dicha proteína. El perfil peptídico del hidrolizado varió durante las primeras 24 horas de incubación, liberándose fragmentos más hidrofílicos, con tiempos de retención entre 0 y 30 minutos, no susceptibles a la acción de la enzima, por lo que el perfil se mantuvo similar a las 36 y 48 horas de hidrólisis.

Las enzimas microbianas actuaron más rápidamente sobre la  $\beta$ -Lg que las enzimas digestivas. En la Figura 5 se muestran los cromatogramas de los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg caprina por la termolisina. A los 30 minutos de incubación, la  $\beta$ -Lg había desaparecido totalmente. Sin embargo, Schmidt y Poll, (1991) no habían observado la hidrólisis total de esta proteína hasta las 23 horas de incubación. Estos autores llevaron a cabo la hidrólisis en un tampón Tris-HCl 0,1 M, de pH 8,0 a 30°C, añadiendo la enzima en una relación E/S del 0,1%. La mayor velocidad de acción de la termolisina en nuestro estudio pudo ser debida a la mayor temperatura de incubación y a la mayor relación E/S empleada (0,5%). Además, la resistencia de la termolisina a altas temperaturas pudo impedir su inactivación mediante el tratamiento térmico aplicado en nuestro estudio, por lo que el tiempo de acción de la enzima sobre la proteína pudo ser superior a los 30 minutos. Se ha comprobado que la adición de calcio al medio de reacción favorece la estabilidad de la termolisina (Fontana, 1988), pero no incrementa su actividad enzimática. Los fragmentos peptídicos liberados desde el inicio de la reacción fueron de pequeño tamaño, con tiempos de retención entre 0 y 20 minutos. El perfil cromatográfico varió durante las primeras 8 horas de incubación, manteniéndose similar a tiempos posteriores, lo que se debió a la ausencia en los péptidos formados durante los primeros estadios de la hidrólisis de enlaces peptídicos susceptibles a la acción de la termolisina.

La proteinasa K actuó de manera similar a la termolisina, hidrolizando totalmente la  $\beta$ -Lg a los 30 minutos de incubación. Esta rapidez de acción de la proteinasa K ya había sido observada por Schmidt y Poll (1991), que tras 30 minutos no detectaron en el gel de electroforesis la presencia de la  $\beta$ -Lg ni de péptidos de gran tamaño. El empleo en el tampón de reacción de una solución de bicarbonato amónico 0,1 M, de pH 8,0, y la



**Figura 5.** Perfiles cromatográficos de (a)  $\beta$ -Lg caprina y de sus hidrolizados con termolisina a las (b) 2 horas, (c) 8 horas, (d) 24 horas y (e) 48 horas de incubación, obtenidos mediante RP-HPLC

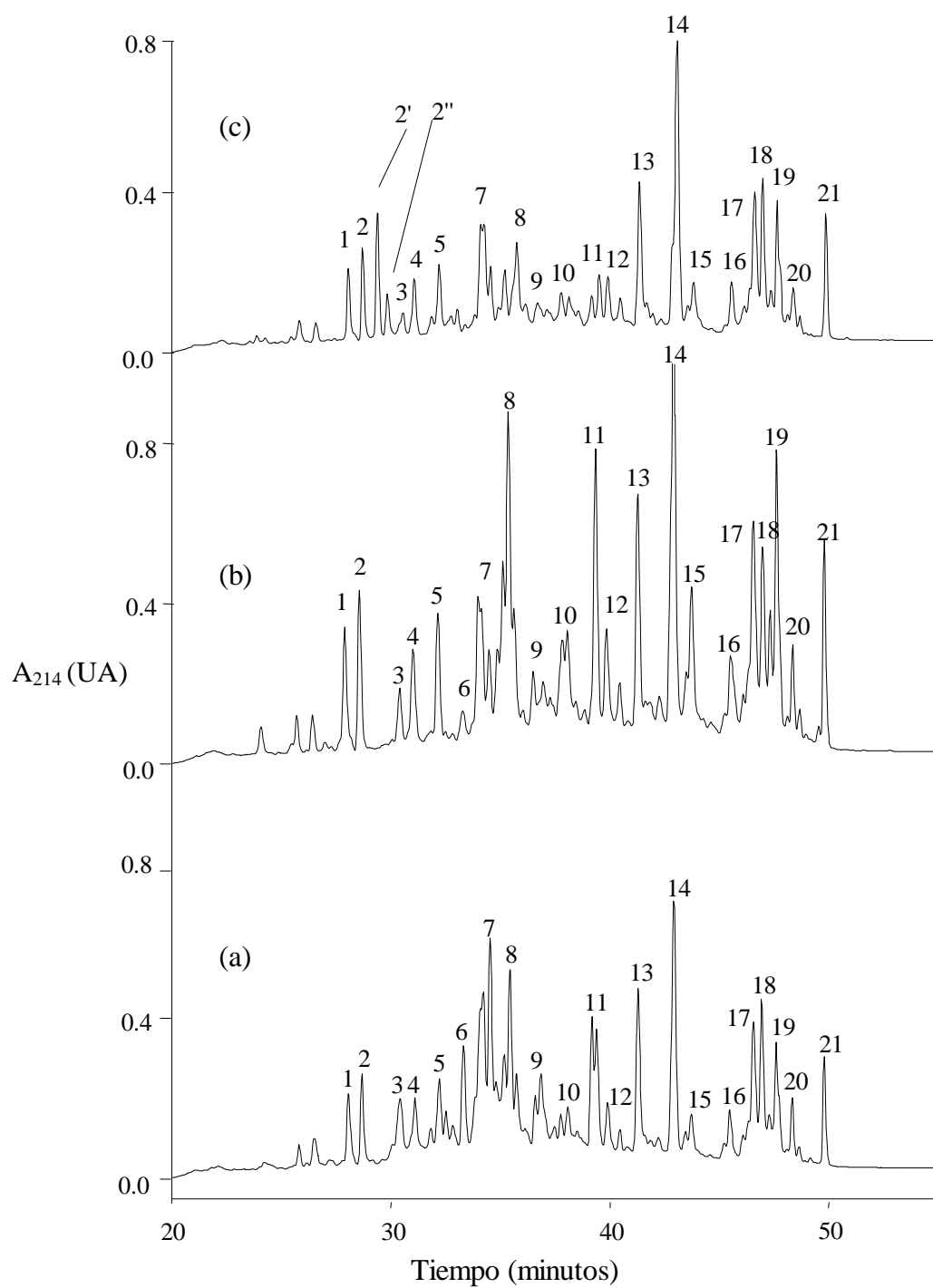


incubación a menor temperatura y con menor relación E/S empleada por estos autores no afectaron a la capacidad proteolítica de la proteinasa K. El perfil cromatográfico de los hidrolizados con proteinasa K varió durante las primeras 24 horas de incubación, manteniéndose similar a las 36 y 48 horas.

### **3.1.2.1. Perfil peptídico de los hidrolizados**

Debido a los cambios producidos en el perfil peptídico de los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg por las cuatro enzimas durante las primeras 8-24 horas de incubación y la homología de este perfil a tiempos posteriores, 36 y 48 horas, se seleccionaron los hidrolizados obtenidos a las 24 horas para llevar a cabo el análisis del perfil peptídico. La identificación de los péptidos eluidos por RP-HPLC y que contenían aminoácidos aromáticos en su estructura se realizó de acuerdo con el protocolo de Bartolomé y col., (1997). Para ello, se determinaron varios parámetros espectrales, como el máximo de absorción del espectro original (valor de la longitud de onda del máximo del espectro original), el intervalo de convexidad de la banda espectral (distancia entre el máximo y el mínimo de la 1ª derivada del espectro) y los máximos de la 2ª derivada (valor de la longitud de onda del máximo principal de la 2ª derivada del espectro). Estos parámetros espectrales permitieron detectar la presencia de aminoácidos aromáticos en los fragmentos peptídicos. Debido a la influencia descrita por Cheung y col., (1980) de los aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos sobre la actividad inhibitoria de la ACE de los péptidos, la identificación de estos aminoácidos en los péptidos eluidos mediante RP-HPLC podría servir de información para el posterior aislamiento y caracterización de las fracciones activas.

En la Figura 6 se muestran los cromatogramas correspondientes a los hidrolizados trípticos de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina de suero ácido y dulce a las 24 horas de incubación, observándose diferencias entre ellos, tanto cualitativas como cuantitativas. En el cromatograma del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg ovina se observaron 21 picos, con mayores intensidades en el correspondiente al de la  $\beta$ -Lg de suero ácido. Esto fue debido a la mayor pureza de esta preparación de  $\beta$ -Lg. La secuencia de la  $\beta$ -Lg bovina presenta 17 enlaces peptídicos en los que la Lys o la Arg aportan el grupo carbonilo, por lo que son susceptibles a la acción de la tripsina (Chobert y col., 1991) y pueden permitir la formación de 16 fragmentos peptídicos. Sin embargo, el enlace Lys<sub>47</sub>-Pro<sub>48</sub> no se ha descrito como



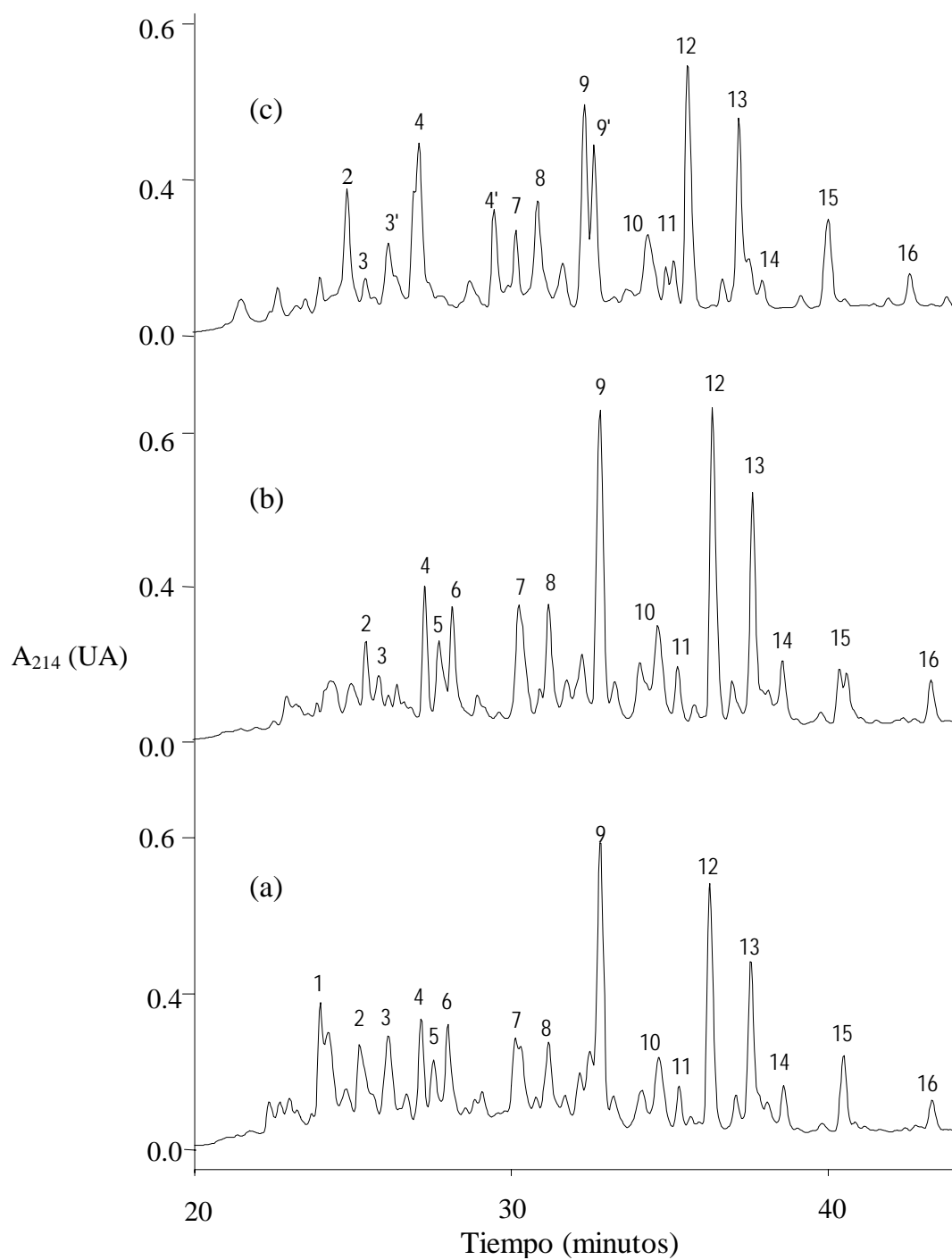
**Figura 6.** Perfiles peptídicos de los hidrolizados trípticos de (a)  $\beta$ -Lg ovina de suero dulce, (b)  $\beta$ -Lg ovina de suero ácido y (c)  $\beta$ -Lg caprina de suero ácido a las 24 horas de incubación, obtenidos mediante RP-HPLC

sensible a la hidrólisis trípica. La secuencia de la  $\beta$ -Lg ovina no presenta nuevos enlaces peptídicos susceptibles a la acción de la tripsina, por lo que el número de fragmentos esperados sería el mismo que en el hidrolizado de la  $\beta$ -Lg bovina. Sin embargo, en el cromatograma se observó un mayor número de picos, constituidos posiblemente por los péptidos procedentes de la acción sobre la proteína de la quimotripsina, enzima presente en cantidades traza en la solución de tripsina. En el cromatograma de la  $\beta$ -Lg ovina procedente de suero dulce se observaron diferencias con respecto al de la  $\beta$ -Lg de suero ácido, fundamentalmente en la región de los picos 7 y 8 y en el pico 11 que se desdobló en dos picos. La secuencia del CMP presenta tres Lys susceptibles a la acción de la tripsina, lo que pudo conducir a la liberación de nuevos fragmentos, que podrían eluir aislados o combinados con los péptidos derivados de la  $\beta$ -Lg. En el cromatograma del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg caprina, aparecieron dos nuevos picos, enumerados como 2' y 2''. Teniendo en cuenta la secuencia de la  $\beta$ -Lg de cabra, estos dos nuevos picos podrían corresponder a los fragmentos f(125-130) y f(131-135), liberados tras la acción de la tripsina sobre el enlace 130-131 del péptido TPEVDKEALEK f(125-135), en el que el grupo carbonilo es aportado por el aminoácido Lys, que sustituye al aminoácido Asn en la secuencia de la  $\beta$ -Lg ovina.

Los péptidos que eluyeron al final del análisis cromatográfico de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina de suero ácido y con mayor intensidad estaban constituidos por aminoácidos aromáticos. Los picos 19 y 21 contenían el aminoácido Tyr, el pico 17 contenía el aminoácido Phe y los picos 11, 13 y 14 contenían el aminoácido Trp, sólo o combinado con Phe y/o Tyr. El resto de los picos no contenían aminoácidos aromáticos. Así, los picos 2' y 2'', observados en el cromatograma de la  $\beta$ -Lg caprina no contenían aminoácidos aromáticos, lo que apoyó la hipótesis de la presencia de los fragmentos f(125-130) y f(131-135) en estos picos. En el hidrolizado de la  $\beta$ -Lg ovina de suero dulce, los picos de mayor señal de intensidad, 7, 13 y 14 contenían aminoácidos aromáticos combinados y los picos 8 y 18 no tenían aminoácidos aromáticos, al igual que los picos de señal de absorbancia menos intensa.

La proteinasa K hidroliza aquellos enlaces peptídicos en los que el grupo carbonilo es cedido preferentemente por un aminoácido aromático o hidrofóbico. Por esta razón, muchos de los fragmentos liberados contenían aminoácidos aromáticos en su secuencia, como los presentes en los picos 7, 9, 12 y 13 (Figura 7). A pesar del alto contenido de aminoácidos susceptibles a la hidrólisis en la secuencia de la  $\beta$ -Lg, sólo se observaron en el cromatograma 16 picos. Esto pudo deberse al solapamiento de péptidos que presentaron el mismo tiempo de retención o a la existencia de enlaces, teóricamente susceptibles a la acción de la proteinasa K, pero no accesibles a la enzima. Las diferencias entre los perfiles peptídicos del hidrolizado de  $\beta$ -Lg ovina y caprina procedente de suero ácido a las 24 horas de incubación con la proteinasa K fueron principalmente cualitativas, y pudieron ser debidas a la susceptibilidad o resistencia de los enlaces peptídicos a la acción de la enzima, en función de la estructura conformacional de la proteína. En el hidrolizado de la  $\beta$ -Lg ovina se observaron los picos 5 y 6, que no aparecieron en el cromatograma del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg caprina, en el que aparecieron tres nuevos picos, 3', 4' y 9', compuestos por aminoácidos aromáticos. Los picos de mayor señal de intensidad contenían aminoácidos aromáticos, como Phe en el pico 9, Trp, sólo o combinado con Tyr y/o Phe en los picos 12 y 13 y Tyr en el pico 4. Los picos 6 y 8 no contenían aminoácidos aromáticos. En el cromatograma del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg ovina procedente de suero dulce, los picos mayoritarios, 9, 12 y 13 contenían aminoácidos aromáticos. Además, se observó la formación de un nuevo fragmento peptídico (pico 1), posiblemente debido a la acción de la proteinasa K sobre el CMP. El resto de péptidos procedentes de este macropéptido podrían haber eluido junto a los péptidos derivados de la  $\beta$ -Lg.

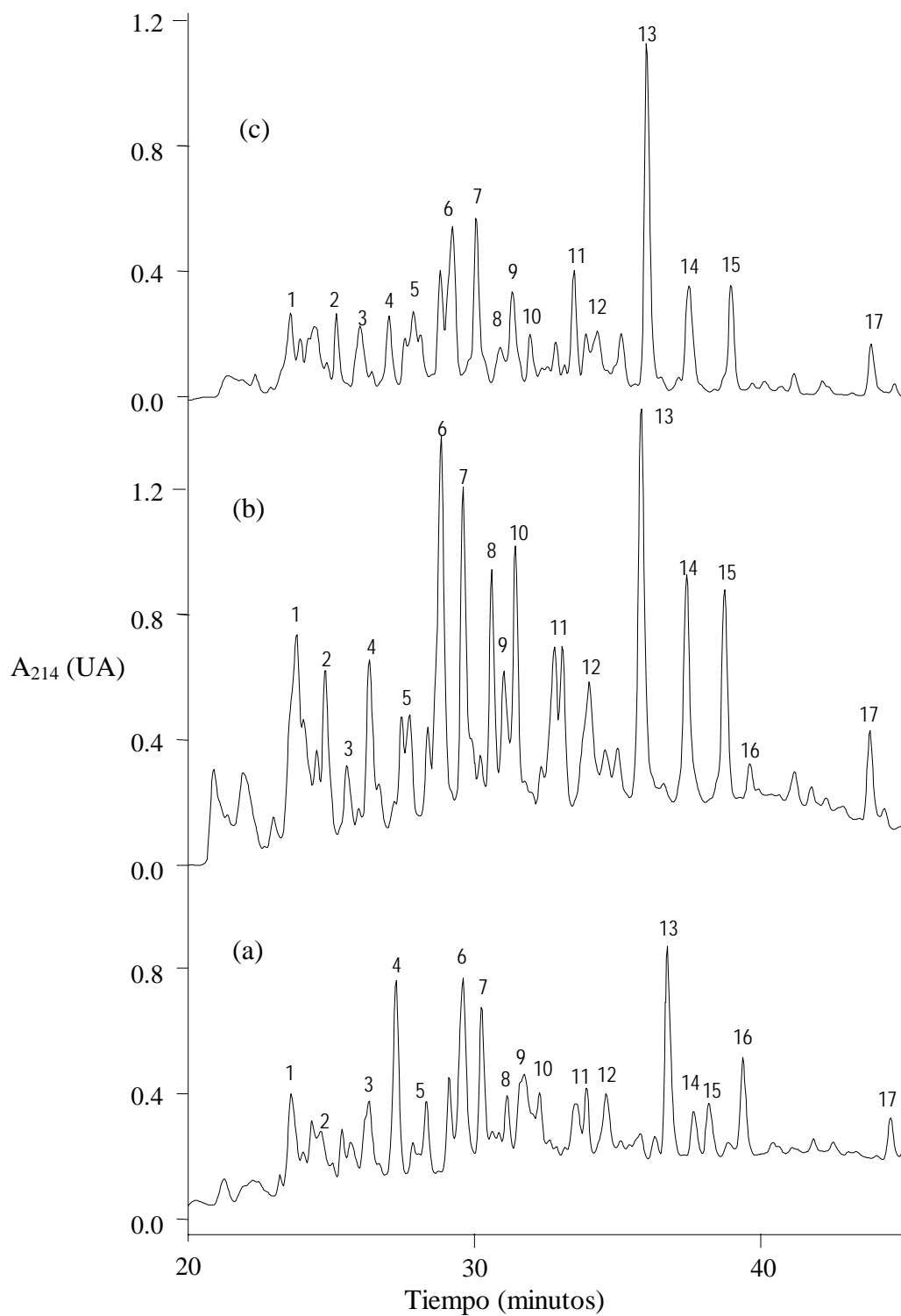
La termolisina hidroliza los enlaces peptídicos X-Y-Z, en los que X puede ser Leu, Phe, Ile, Val, Met y Ala y Z no debe ser Pro. El número de péptidos que pueden liberarse a partir de la  $\beta$ -Lg tras la acción de esta enzima es muy elevado debido a la gran cantidad de enlaces peptídicos teóricamente susceptibles a la hidrólisis. Muchos de estos péptidos pueden contener aminoácidos aromáticos en su composición. En los cromatogramas correspondientes a los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg por la termolisina a las 24 horas de incubación se observaron 17 picos, con diferencias fundamentalmente cuantitativas entre los cromatogramas según la especie y el tipo de suero a partir del cual se obtuvo la  $\beta$ -Lg



**Figura 7.** Perfiles peptídicos de los hidrolizados por la proteinasa K de (a)  $\beta$ -Lg ovina de suero dulce, (b)  $\beta$ -Lg ovina de suero ácido y (c)  $\beta$ -Lg caprina de suero ácido a las 24 horas de incubación, obtenidos mediante RP-HPLC

(Figura 8). Los picos del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg ovina procedente de suero ácido presentaron mayor intensidad, debido a la mayor pureza de la preparación de  $\beta$ -Lg. Los aminoácidos aromáticos se identificaron en el pico 1, que contenía Tyr y Phe, en los picos 4 y 7, que tenían Phe, el pico 6, que contenía Tyr y los picos 8, 10, 13, 14 y 15, que contenían Trp, sólo o en combinación. Los picos mayoritarios del cromatograma del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg ovina de suero dulce fueron los picos 4 y 7, que tenían Phe, el pico 6, que contenía Tyr y el pico 13, en el que se identificó la presencia de Trp, sólo o combinado con Phe o Tyr. En el hidrolizado de la  $\beta$ -Lg caprina, el pico 6 se desdobló en dos picos, uno de ellos contenía Tyr, similar al identificado en el hidrolizado de la  $\beta$ -Lg ovina y otro que no presentó aminoácidos aromáticos. El pico 7 contenía Phe y en los picos 11 y 13 se identificó el aminoácido Trp, sólo o combinado con Phe o Tyr.

Tras esta primera identificación de los aminoácidos aromáticos presentes en los péptidos liberados tras la hidrólisis de la  $\beta$ -Lg por las cuatro enzimas empleadas en el estudio, cuya influencia en la actividad inhibitoria de la ACE ha sido descrita por distintos autores, sería necesaria la confirmación de los resultados obtenidos mediante procesos de aislamiento y caracterización de dichos péptidos.



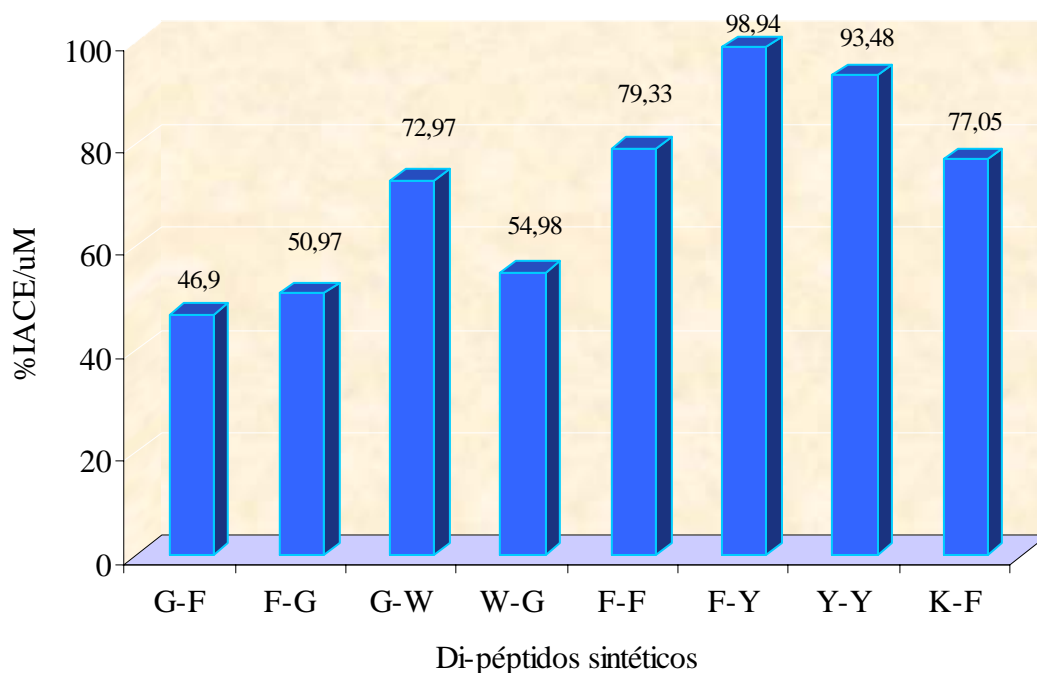
**Figura 8.** Perfiles peptídicos de los hidrolizados con termolisina de la (a)  $\beta$ -Lg ovina de suero dulce, (b)  $\beta$ -Lg ovina de suero ácido y (c)  $\beta$ -Lg caprina de suero ácido a las 24 horas de incubación, obtenidos mediante RP-HPLC

### **3.1.3. Determinación de la actividad inhibitoria de la ACE**

Para llevar a cabo la determinación de la actividad inhibitoria de la ACE, fue necesario optimizar las condiciones del método descrito por Kim y col., (1999). Se estudiaron los distintos factores que afectaban a la reacción de la ACE, como la concentración de sustrato HHL, el tampón de reacción, el tiempo de incubación y los métodos de inactivación de la ACE y de extracción del ácido hipúrico. Se realizaron unos primeros ensayos determinado la actividad inhibitoria de la ACE en diferentes sustratos de naturaleza peptídica y aminoacídica. Inicialmente, se midió la actividad en un derivado peptídico, N-succinil-L-prolina. El valor del IC<sub>50</sub> obtenido para este compuesto fue de 144 mg/L. Este valor concuerda con el obtenido por Ondetti y col., (1977) que fue de 135 mg/L.

Posteriormente y con el objetivo de confirmar la importancia del tamaño y de la composición aminoacídica de los péptidos en la unión a los sitios activos de la ACE, se determinó la actividad inhibitoria de la ACE de distintos di-péptidos sintéticos, constituidos por al menos un aminoácido aromático y/o con la posición de los dos aminoácidos alternada. Se prepararon soluciones de los dipéptidos de concentración peptídica aproximada 2 mg/mL. Los valores de la relación entre el porcentaje de inhibición de la ACE y la concentración peptídica se muestran en la Figura 9. Los valores más elevados se observaron en los dipéptidos con Phe, Tyr y Trp en el extremo C-terminal, excepto en el dipéptido Gly-Phe. Estos resultados confirmaron la importancia de la presencia de aminoácidos aromáticos en esta posición para favorecer la unión del péptido a los sitios activos de la ACE (Cheung y col., 1980). La combinación de dos aminoácidos aromáticos incrementó la actividad inhibitoria de la ACE, alcanzándose valores de 79,3 en el dipéptido Phe-Phe, de 93,5 en el dipéptido Tyr-Tyr y de 98,9 en el dipéptido Phe-Tyr. El dipéptido Lys-Phe presentó un valor de 77, en relación al 46,95 del dipéptido Gly-Phe, lo que confirmó la contribución del grupo ε-amino de la Lys a la potencia inhibitoria del péptido (Cheung y col., 1980).





**Figura 9.** Relación entre el porcentaje de inhibición de la ACE (%) y la concentración peptídica ( $\mu$ M) de di-péptidos sintéticos

Además, se quiso comprobar la necesidad del enlace peptídico en la unión del péptido al sitio activo de la ACE y en la consecuente inhibición de su actividad. Para ello, se prepararon soluciones de los aminoácidos sintéticos, Asp, Glu, Phe, Tyr, Leu, Ser, Cys, Met, Pro y Val, en una concentración aproximada de 2 mg/mL, determinándose el porcentaje de inhibición de la ACE. Todos los aminoácidos estudiados presentaron porcentajes de inhibición menores al 10%, a excepción de la Cys, que a la concentración estudiada inhibió el 100% de la actividad de la ACE. El valor del  $IC_{50}$  de la Cys fue de 0,47  $\mu$ M ( $y=32,448\ln(x) + 74,263$ ;  $R^2=0,9888$ ). Según Cushman y Cheung, (1971), los dos electrones desapareados del azufre de este aminoácido se fijan al zinc, lo retiran del medio y evitan su participación en la reacción enzimática, por lo que dicha reacción no se produce. Para comprobar este mecanismo de acción, se determinó la actividad inhibitoria de la ACE del aminoácido Met, que contiene el grupo azufre metilado. El porcentaje de inhibición de este aminoácido fue inferior al 2%, lo que demostró que la unión al zinc no era el mecanismo de acción de la Cys. Los estudios de Das y Soffer, (1975) habían revelado la capacidad de la Cys para formar enlaces disulfuro con aquellas enzimas que

contienen grupos sulfhidrilo libres. La ACE presenta estos grupos, por lo que la formación de estos enlaces desestabilizaría su estructura, impidiendo la actividad sobre el sustrato.

Una vez optimizadas las condiciones del proceso, detalladas en el apartado 2.1.4., se llevó a cabo la determinación de la actividad inhibitoria de la ACE en los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina por la acción de las cuatro enzimas y a los distintos tiempos de incubación. Previamente, y con el fin de confirmar la acción inhibitoria de la ACE de los péptidos, se llevó a cabo el estudio de la actividad en la  $\beta$ -Lg ovina y caprina, previa a la hidrólisis, a la misma concentración proteica (3 mg/mL) de la que se partió en la preparación de los hidrolizados. Los porcentajes de inhibición de la ACE fueron inferiores al 2%. Mullally y col., (1997a) habían descrito porcentajes de inhibición del 9% en la  $\beta$ -Lg bovina comercial. Estos resultados confirmaron, por tanto, la necesidad de un proceso de hidrólisis que permitiera la liberación de péptidos con actividad inhibitoria de la ACE desde su estado inactivo en la proteína precursora.

En la Tabla 12 se muestran los porcentajes de inhibición de la ACE en los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina procedentes de suero ácido y dulce con las cuatro proteasas y a los distintos tiempos de incubación. La evolución de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de incubación de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina con la tripsina se muestra en la Figura 10. A los 30 minutos de incubación ya pudo detectarse la presencia de actividad inhibitoria de la ACE, principalmente en el hidrolizado de la  $\beta$ -Lg caprina, a pesar de no haberse hidrolizado totalmente la proteína. Estos resultados confirmaron que bajos grados de hidrólisis son suficientes para la liberación de péptidos bioactivos (Mullally y col., 1997a). El incremento de la actividad se observó para todos los hidrolizados, siendo más notable en el hidrolizado de la  $\beta$ -Lg ovina procedente de suero ácido. Sin embargo, los valores máximos de actividad inhibitoria de la ACE, alcanzados a las 24 horas, fueron similares para los tres hidrolizados, superiores al 70%. Sin embargo, Mullally y col., (1997b) habían descrito los mayores porcentajes de inhibición de la ACE en los hidrolizados trépticos de la  $\beta$ -Lg bovina a las 4 horas de incubación. Esto pudo ser debido a la mayor concentración de la solución de proteína (8%, p/v) empleada por estos autores. Tras estas primeras 24 horas, la actividad inhibitoria de la ACE descendió, de manera más acusada en los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina procedente de suero

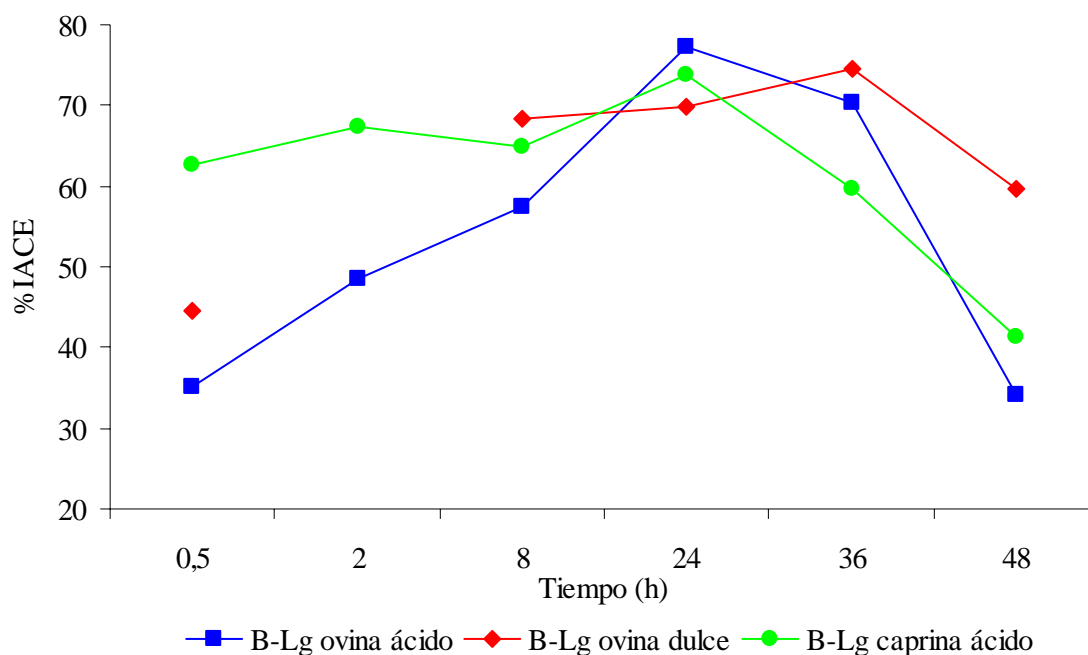
**Tabla 12.** Actividad inhibitoria de la ACE (%) con respecto al tiempo de hidrólisis de los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina por la acción de la tripsina, quimotripsina, proteinasa K y termolisina

Tiempo de hidrólisis (h)	Actividad inhibitoria de la ACE (%)											
	Tripsina			Quimotripsina			Proteinasa K			Termolisina		
	$\beta$ -Lg <sup>a</sup> ovina	$\beta$ -Lg <sup>b</sup> ovina	$\beta$ -Lg caprina	$\beta$ -Lg <sup>a</sup> ovina	$\beta$ -Lg <sup>b</sup> ovina	$\beta$ -Lg caprina	$\beta$ -Lg <sup>a</sup> ovina	$\beta$ -Lg <sup>b</sup> ovina	$\beta$ -Lg caprina	$\beta$ -Lg <sup>a</sup> ovina	$\beta$ -Lg <sup>b</sup> ovina	$\beta$ -Lg caprina
0,5	35,1	44,5	62,7	27,0	38,9	36,0	78,1	80,3	63,5	81,5	84,3	91,2
2	48,5	---	67,3	34,0	56,8	50,5	85,3	91,1	58,0	84,7	82,5	89,6
8	57,5	68,4	64,9	46,9	65,3	55,1	84,0	75,9	73,9	80,0	77,0	84,5
24	77,3	69,8	73,9	51,9	75,6	66,4	79,4	87,8	76,0	72,7	66,2	81,7
36	70,3	74,6	59,7	69,2	62,7	64,7	67,6	88,2	36,0	73,4	75,2	81,1
48	34,2	59,6	41,2	67,9	62,4	66,4	76,8	91,2	37,2	66,4	62,9	83,2

Valor medio del triplicado (n=3)

<sup>a</sup> Obtenida a partir de suero ácido

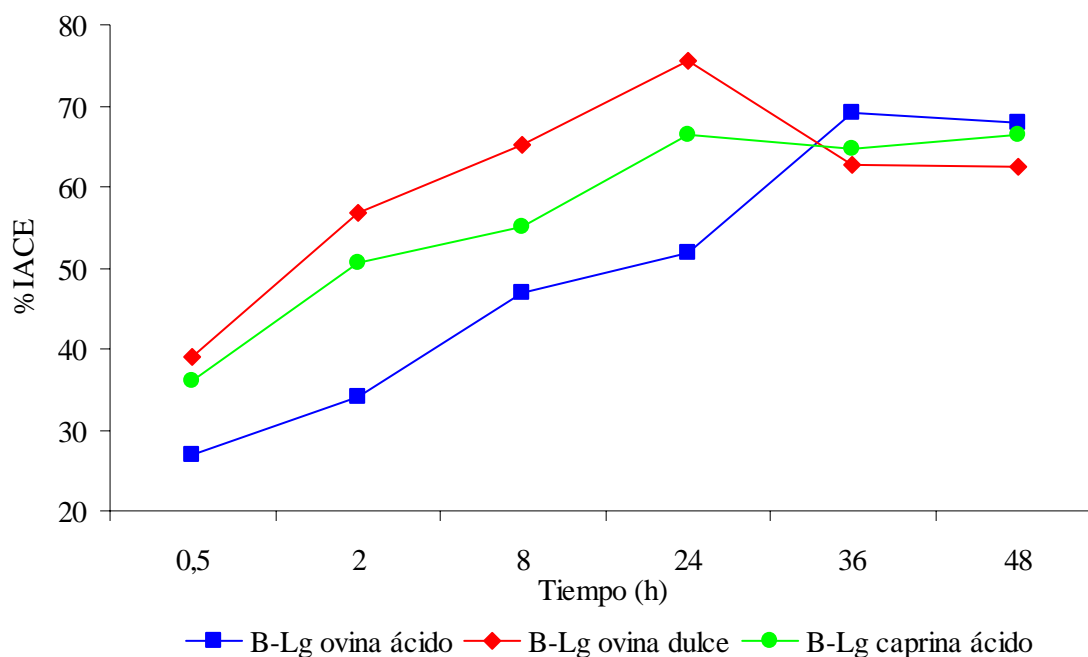
<sup>b</sup> Obtenida a partir de suero dulce



**Figura 10.** Evolución de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de incubación de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina con la tripsina

ácido. Esta disminución de la actividad con el tiempo de hidrólisis pudo ser debida a la hidrólisis de los péptidos activos formados durante las primeras horas, liberándose secuencias inactivas. De manera análoga, Meisel y col., (1997) han descrito la hidrólisis de secuencias bioactivas y consecuentemente la disminución de la actividad inhibitoria de la ACE en el queso tras largos períodos de maduración.

La evolución de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de incubación de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina con la quimotripsina se muestra en la Figura 11. De manera similar a los hidrolizados por la tripsina, tras los primeros 30 minutos de incubación con la quimotripsina, ya se detectaba actividad. El incremento de dicha actividad tuvo lugar para los tres hidrolizados, alcanzándose valores superiores al 65% tras 24 horas de incubación de la  $\beta$ -Lg ovina de suero dulce y la  $\beta$ -Lg caprina y tras 48 horas de incubación de la  $\beta$ -Lg ovina de suero ácido con la enzima pancreática. Tras este tiempo, la actividad se mantuvo constante en valores de inhibición de la ACE superiores al 60%. Esta persistencia de la actividad pudo deberse a la ausencia de enlaces peptídicos susceptibles a la progresiva acción de la quimotripsina, en los péptidos bioactivos formados durante los primeros estadios de la hidrólisis.



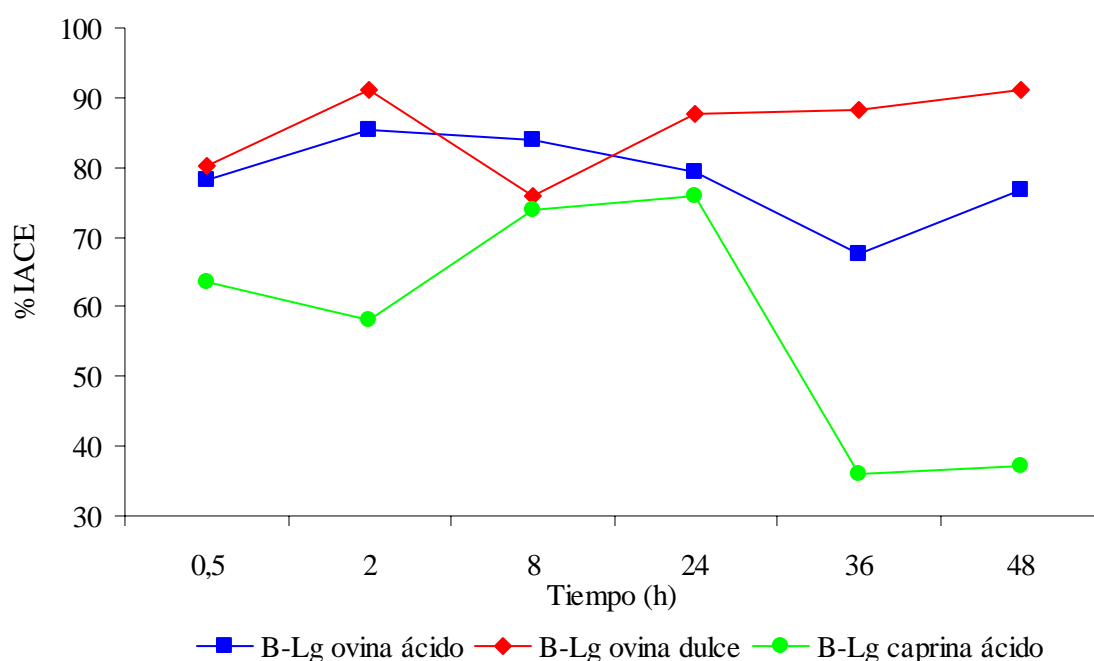
**Figura 11.** Evolución de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de incubación de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina con la quimotripsina

Debido a la especificidad proteolítica de la quimotripsina, los péptidos procedentes de la  $\beta$ -Lg presentaron aminoácidos aromáticos en el extremo C-terminal. Se ha visto que los aminoácidos Trp, Tyr y Phe situados en esta posición favorecen la unión y consecuente inhibición de la ACE (Cheung y col., 1980). Por lo tanto, podrían esperarse mayores porcentajes de inhibición en los hidrolizados por la quimotripsina con respecto a los de los hidrolizados trópticos. Sin embargo, los porcentajes de inhibición de la ACE en los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina procedentes de suero ácido fueron inferiores. Esto pudo deberse al menor grado de hidrólisis de la  $\beta$ -Lg tras la acción de esta enzima, lo que se había observado en los cromatogramas correspondientes a los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg por la tripsina y quimotripsina, obtenidos tras el mismo tiempo de incubación.

Por el contrario, la actividad inhibitoria de la ACE en el hidrolizado de la  $\beta$ -Lg ovina procedente de suero dulce a las 24 horas de incubación fue del 75,6%, similar al determinado en el hidrolizado de esta misma proteína por la tripsina. El mayor porcentaje de inhibición determinado en este hidrolizado con respecto al del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg

ovina de suero ácido para el mismo tiempo de incubación pudo ser debido a la contribución en la actividad de los fragmentos liberados tras la acción de las enzimas digestivas sobre el CMP que acompaña a la  $\beta$ -Lg de suero dulce. Abubakar y col., (1998) habían descrito porcentajes de inhibición de la ACE en un hidrolizado de suero de quesería por la quimotripsina del 76%. Esta actividad, similar a la determinada en nuestro estudio, a pesar de emplear una menor concentración proteica, fue debida a la acción de todos los péptidos derivados de las proteínas constituyentes del suero.

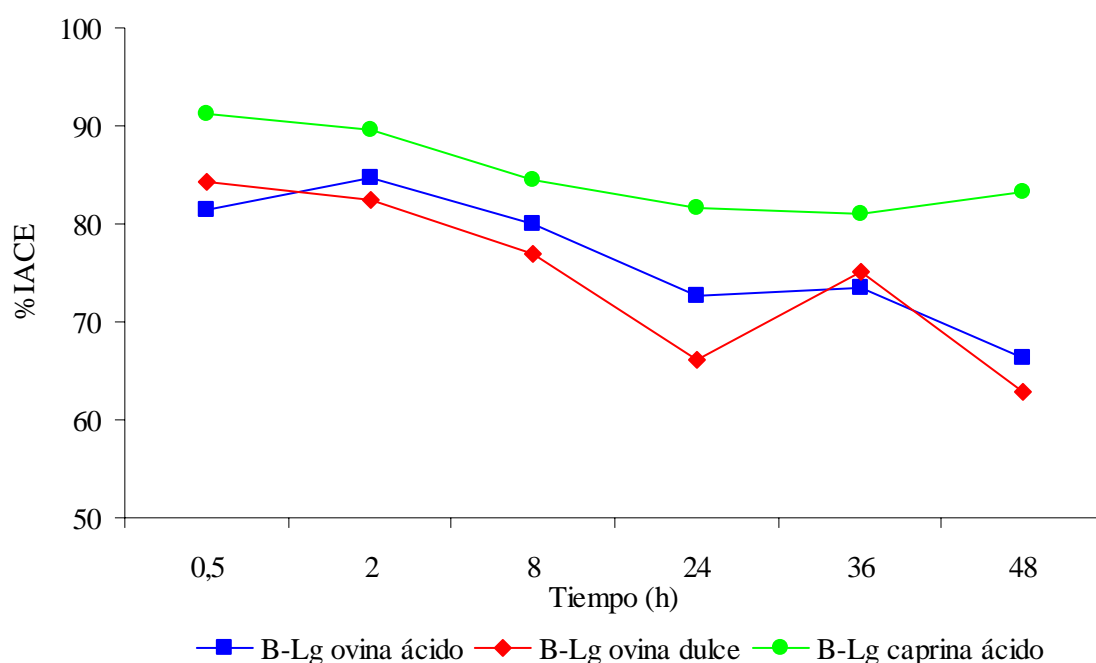
La actividad inhibitoria de la ACE en los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg obtenidos tras la acción de las enzimas microbianas fueron superiores a los observados en los hidrolizados digestivos. Estos resultados concuerdan con los descritos por Abubakar y col., (1998) en hidrolizados de  $\beta$ -Lg bovina. La evolución de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de incubación de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina con la proteinasa K se muestra en la Figura 12.



**Figura 12.** Evolución de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de incubación de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina con la proteinasa K

El comportamiento de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de acción de la proteinasa K fue muy variable en función de la especie de origen de la  $\beta$ -Lg. A los 30 minutos de incubación, los porcentajes de inhibición de la ACE fueron muy elevados, superando el 63% para los tres hidrolizados y alcanzando el 80% en el hidrolizado de la  $\beta$ -Lg ovina de suero dulce. Esta elevada actividad pudo ser debida, tanto a la rapidez de acción de la enzima, como a su especificidad proteolítica. La proteinasa K actúa muy rápidamente sobre la  $\beta$ -Lg, por lo que esta proteína se había hidrolizado totalmente en los primeros minutos de hidrólisis. Esta rapidez de acción se había puesto de manifiesto mediante el análisis cromatográfico (apartado 3.1.2.). Además, teniendo en cuenta la especificidad de esta enzima y el gran número de enlaces peptídicos presentes en la secuencia de la  $\beta$ -Lg y susceptibles a la hidrólisis, podría esperarse que los fragmentos formados presentaran bajo peso molecular. Se ha comprobado que los péptidos de pequeño tamaño, principalmente di- y tri-péptidos son los que presentan mayor actividad inhibitoria de la ACE (Cushman y col., 1977). La actividad se incrementó en los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg ovina procedente de suero ácido y dulce hasta alcanzar valores máximos a las 2 horas de incubación, del 85% y del 91%, respectivamente, que se mantuvieron constantes durante todo el proceso. Sin embargo, en los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg caprina, la actividad aumentó gradualmente hasta las 24 horas (76%), disminuyendo de manera acusada a las 36 y 48 horas de incubación. Las diferencias en la secuencia primaria de la  $\beta$ -Lg caprina con respecto a la de la  $\beta$ -Lg ovina pudieron permitir la acción progresiva de la proteinasa K sobre los péptidos bioactivos formados en los primeros estadios de la hidrólisis y la consecuente pérdida de actividad de los mismos.

La evolución de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de incubación de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina con la termolisina se muestra en la Figura 13. Pudo observarse una tendencia de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de hidrólisis bastante similar, independientemente de la especie animal de origen de la leche y del tipo de suero empleado en la obtención de la  $\beta$ -Lg. Los porcentajes de inhibición más elevados se observaron en los hidrolizados obtenidos tras los primeros 30 minutos de incubación con la termolisina, con valores superiores al 80% en los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg ovina y al 90% en los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg caprina. Al igual que con la proteinasa K, la rapidez de acción y la especificidad de la termolisina permitieron la liberación de péptidos



**Figura 13.** Evolución de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al tiempo de incubación de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina con la termolisina

de pequeño tamaño y carácter hidrofílico, lo que se había puesto de manifiesto en el análisis cromatográfico (apartado 3.1.2). Estas características de los péptidos pudieron ser las responsables de la elevada actividad inhibitoria de la ACE determinada en los hidrolizados por la esta enzima de origen microbiano. A tiempos superiores de hidrólisis, la actividad siguió una tendencia descendente en los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg ovina. Sin embargo, los porcentajes de inhibición al final de la reacción enzimática fueron próximos al 65%, lo que determinó la persistencia de péptidos de elevada capacidad inhibitoria de la ACE. Esta persistencia fue más notable en el hidrolizado de la  $\beta$ -Lg caprina, para el cual los porcentajes de inhibición se mantuvieron prácticamente constante durante todo el proceso enzimático.



Con el objetivo de comparar de una manera más exacta la actividad de los hidrolizados obtenidos, se determinó el valor del  $IC_{50}$  o concentración proteica necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la ACE en los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina a las 24 horas de incubación con las cuatro proteasas empleadas en el estudio. Para ello, se prepararon soluciones a partir de los hidrolizados, de concentración proteica descendente. El contenido proteico fue determinado mediante el método del BCA. Se midió el porcentaje de inhibición de la ACE en cada una de las soluciones, elaborando una curva de calibrado y extrapolando el valor del  $IC_{50}$ . El análisis de regresión de los valores de actividad con respecto al contenido proteico de los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina se muestran en la Tabla 13. Los puntos experimentales se ajustaron a una curva logarítmica, con coeficientes de determinación ( $R^2$ ) iguales o superiores a 0,9004, excepto para el hidrolizado de la  $\beta$ -Lg ovina de suero ácido por la quimotripsina, que fue de 0,8093. Con las curvas de regresión se extrapoló el valor del  $IC_{50}$ , que se detalla en la Tabla 14.

**Tabla 13.** *Análisis de regresión logarítmico de los valores de actividad inhibitoria de la ACE respecto al contenido proteico en los hidrolizados digestivos y microbianos de la  $\beta$ -Lg ovina y caprina procedente de suero ácido y dulce a las 24 horas de incubación ( $y=a + bLn(x)$ ; siendo  $a$  la ordenada en el origen,  $b$  la pendiente y  $R^2$  el coeficiente de determinación)*

	Tripsina			Quimotripsina			Proteínasa K			Termolisina		
	a	b	R <sup>2</sup>	a	b	R <sup>2</sup>	a	b	R <sup>2</sup>	a	b	R <sup>2</sup>
$\beta$ -Lg <sup>a</sup> ovina	89,087	30,672	0,9608	79,662	19,183	0,8093	99,630	23,131	0,9614	122,40	38,511	0,9128
$\beta$ -Lg <sup>b</sup> ovina	92,663	26,219	0,9295	83,832	27,769	0,9584	91,742	12,775	0,9139	117,71	28,866	0,9407
$\beta$ -Lg <sup>a</sup> caprina	100,490	35,861	0,9982	82,101	33,878	0,9004	88,375	17,986	0,9964	100,41	27,540	0,9831

<sup>a</sup> Obtenida a partir de suero ácido

<sup>b</sup> Obtenida a partir de suero dulce

**Tabla 14.**  $IC_{50}$  de los hidrolizados digestivos y microbianos de  $\beta$ -Lg ovina y caprina a las 24 horas de incubación

Enzima	$IC_{50}$ ( $\mu$ g hidrolizado de $\beta$ -Lg/mL)		
	Ovina		Caprina
	Suero ácido	Suero dulce	Suero ácido
Tripsina	278	196	245
Quimotripsina	213	296	388
Proteinasa K	117	38	118
Termolisina	152	81	161

Como era de esperar, los valores de  $IC_{50}$  de los hidrolizados obtenidos tras la acción de las enzimas microbianas fueron menores a los  $IC_{50}$  de los hidrolizados digestivos. Estos resultados indicaron, bien la presencia de secuencias peptídicas con mayor actividad inhibitoria de la ACE o bien una mayor concentración de péptidos bioactivos en los hidrolizados obtenidos con las enzimas microbianas.

Tras la acción de todas las proteasas, excepto la quimotripsina, se obtuvieron hidrolizados con menor valor de  $IC_{50}$  si la  $\beta$ -Lg procedía de suero dulce. Probablemente, esta mayor actividad puede ser atribuida a los péptidos inhibidores de la ACE procedentes de la hidrólisis del CMP. Sin embargo, Abubakar y col., (1998) habían descrito la inapreciable participación del CMP, la lactosa y los minerales en la actividad inhibitoria de la ACE de los hidrolizados de suero de quesería.

Como los valores de  $IC_{50}$  más bajos correspondieron a los hidrolizados de  $\beta$ -Lg obtenidos con la proteinasa K y la termolisina, optamos por emplear los hidrolizados por la termolisina para llevar a cabo la identificación y caracterización de péptidos inhibidores de la ACE. La hidrólisis por la termolisina se ha empleado en la obtención de péptidos inhibidores de la ACE a partir de músculo de atún (Matsumura y col., 1993), de gallina o a partir de proteínas aisladas, como la zeína (Miyoshi y col., 1991) o la ovoalbúmina de huevo (Fujita y col., 2000). Debido a la especificidad de la enzima, los distintos autores

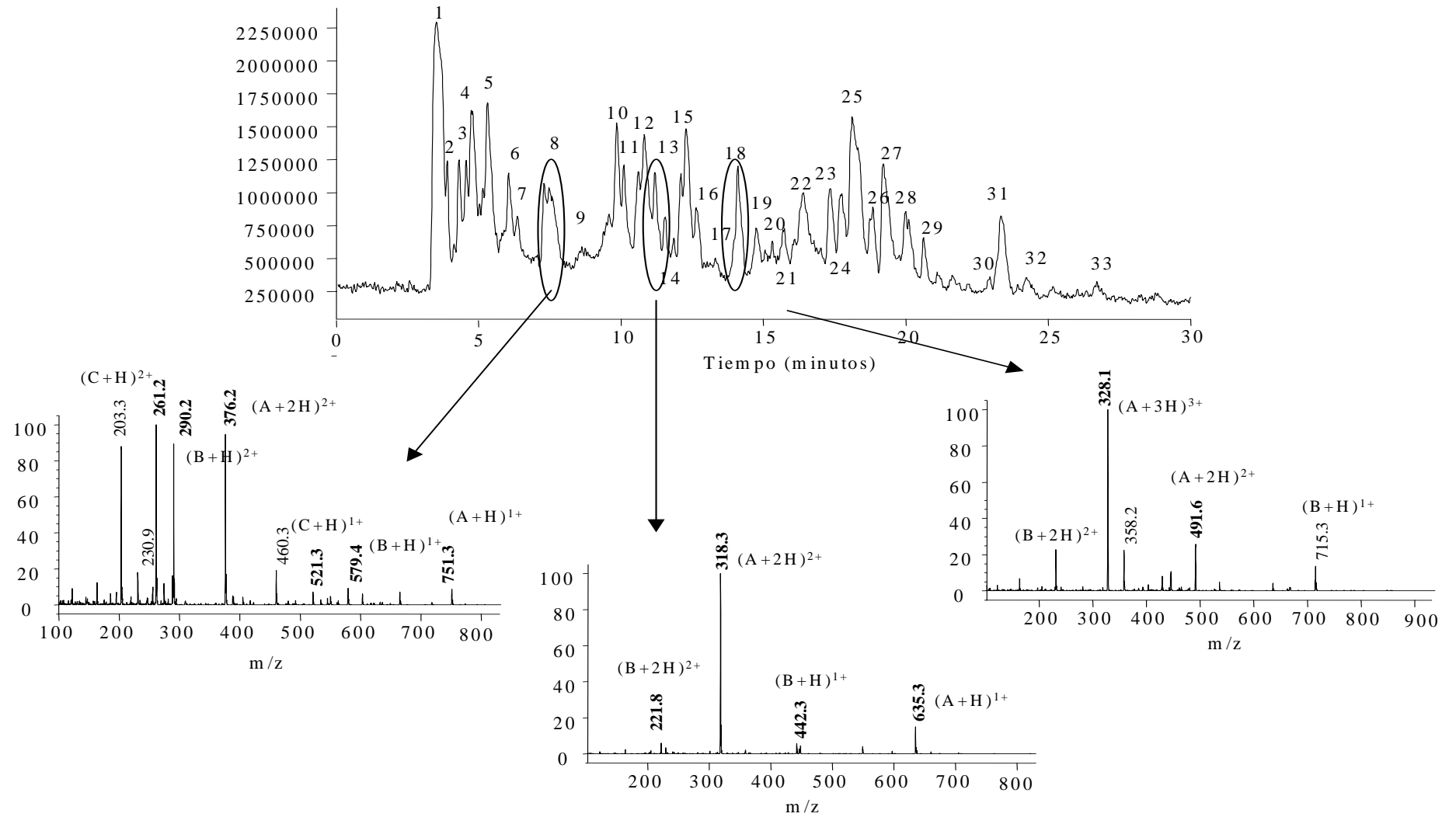
obtuvieron principalmente péptidos con alta actividad inhibitoria de la ACE, que contenían Pro en el extremo C-terminal o en una posición vecina a ésta. Sin embargo, hasta el momento no habían sido estudiados los péptidos formados tras la hidrólisis de la  $\beta$ -Lg por la termolisina, por lo que pareció de gran interés el aislamiento de péptidos con capacidad inhibitoria de la ACE liberados tras la acción de esta enzima de origen microbiano sobre la  $\beta$ -Lg.

#### **3.1.4. Caracterización del hidrolizado de la $\beta$ -Lg caprina por la termolisina mediante HPLC-ESI-MS**

En un primer paso se llevó a cabo la caracterización del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg caprina por la termolisina a las 24 horas de incubación mediante HPLC-ESI-MS, siguiendo el método detallado en el apartado 2.1.5.2. El cromatograma obtenido y el espectro de iones totales de algunas de las fracciones analizadas se muestran en la Figura 14. Pudieron observarse 33 picos en el cromatograma, identificándose tras el análisis por MS uno o más iones moleculares en cada uno de ellos. Conociendo la secuencia de la  $\beta$ -Lg caprina y empleando una base de datos, con una tolerancia del 0,1%, pudieron identificarse algunos de los fragmentos presentes en estos picos.

La secuencia, el fragmento y la masa de los péptidos identificados en este estudio se detallan en la Tabla 15. Algunos de los péptidos identificados o partes de ellos han sido descritos recientemente en la bibliografía como inhibidores de la ACE. Así, en las fracciones 9, 15, 18 y 19 se identificaron varios fragmentos de la zona comprendida entre los aminoácidos 94 y 111 de la secuencia de la  $\beta$ -Lg bovina, algunos de ellos descritos por Pihlanto-Leppälä y col., (2000) como inhibidores de la ACE. De manera similar, la fracción 28 estaba constituida por el péptido f(147-149), de secuencia IRL, definida como inhibidora de la ACE por Mullally y col., (1997a).

Tras esta primera identificación, fue necesario aislar las fracciones y caracterizar aquellas que fueran responsables de la actividad inhibitoria de la ACE en el hidrolizado de la  $\beta$ -Lg caprina por la termolisina.



**Figura 14.** Cromatograma del hidrolizado de  $\beta$ -Lg caprina por la termolisina a las 24 horas y espectro de iones totales de las fracciones (a) 8, (b) 13 y (c) 18

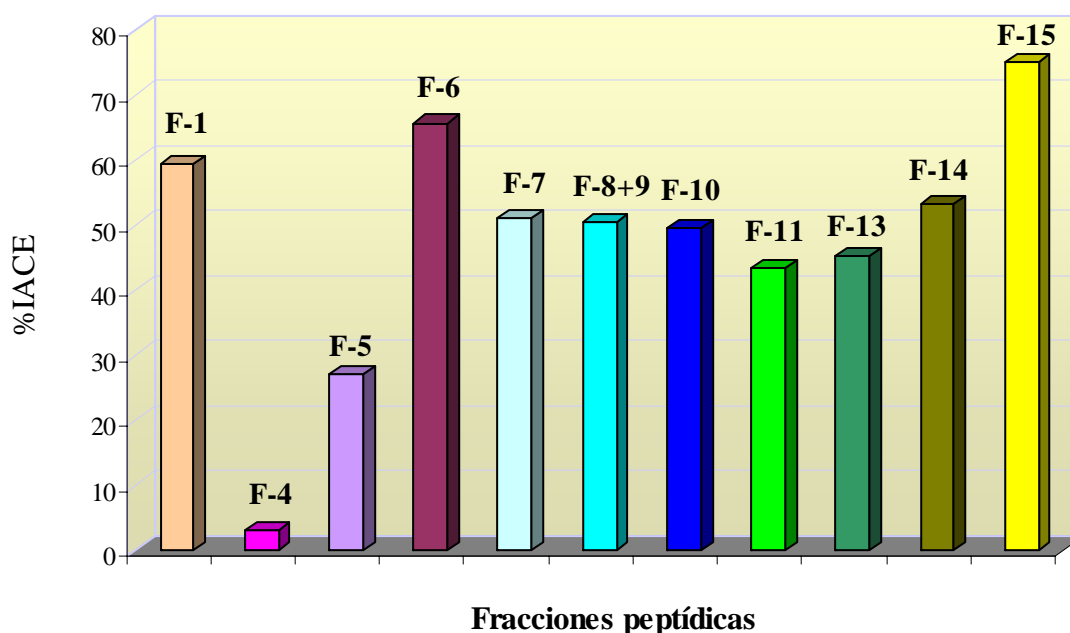
**Tabla 15.** Masa molecular, fragmento y secuencia de los péptidos del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg caprina por la termolisina a las 24 horas de incubación, identificados mediante HPLC-ESI-MS

Nº Fracción	Masa observada	Masa calculada	Fragmento	Secuencia peptídica
4	490,3	490,20	33-37	DAQSA
6	621,3	621,21	62-67	ENGEC A
8	750,3	750,38	41-46	VYVEEL
	578,4	578,27	3-7	VTQTM
	520,3	520,23	115-120	(Q)SLAC(Q)
9	659,3	659,28	110-116	(S)AEPEQ(S)
	408,2	408,20	135-138	(K)FD(K)
13	634,3	634,27	64-69	GECAQK
	441,3	441,26	47-50	KPTP
15	882,2	881,45	95-101	LDTDYKK
17	529,4	529,36	138-142	KALKA
18	981,3	980,52	94-101	VLDTDYKK
19	605,3	605,28	151-155	FNPTQ
	659,3	639,28	110-116	(S)AEPEQ(S)
26	888,5	888,39	59-65	QKWENGE
28	400,3	400,28	147-149	IRL
33	1196,4	1195,65	146-155	HIRLAFNPTQ
	634,3	634,27	64-69	GECAQK

### 3.1.5. Aislamiento y caracterización de péptidos inhibidores de la ACE del hidrolizado de la $\beta$ -Lg caprina por la termolisina

Con el fin de aislar e identificar los péptidos derivados de la  $\beta$ -Lg y responsables de la actividad inhibitoria de la ACE en el hidrolizado originado tras la acción de la termolisina durante 24 horas sobre dicha proteína procedente de suero ácido caprino, se llevaron a cabo sucesivas etapas de RP-HPLC a escala semipreparativa, siguiendo el método descrito en el apartado 2.1.5.1.

Durante la primera etapa cromatográfica, cuyo perfil peptídico se ha mostrado en la Figura 8(c), se recogieron 11 fracciones, enumeradas en el cromatograma como 1, 4, 5, 6, 7, 8+9, 10, 11, 13, 14 y 15. Se recogió suficiente cantidad de cada una de estas fracciones en los sucesivos análisis cromatográficos para determinar la actividad inhibitoria de la ACE. Los porcentajes de inhibición de la ACE de estas fracciones se muestran en la Figura 15.

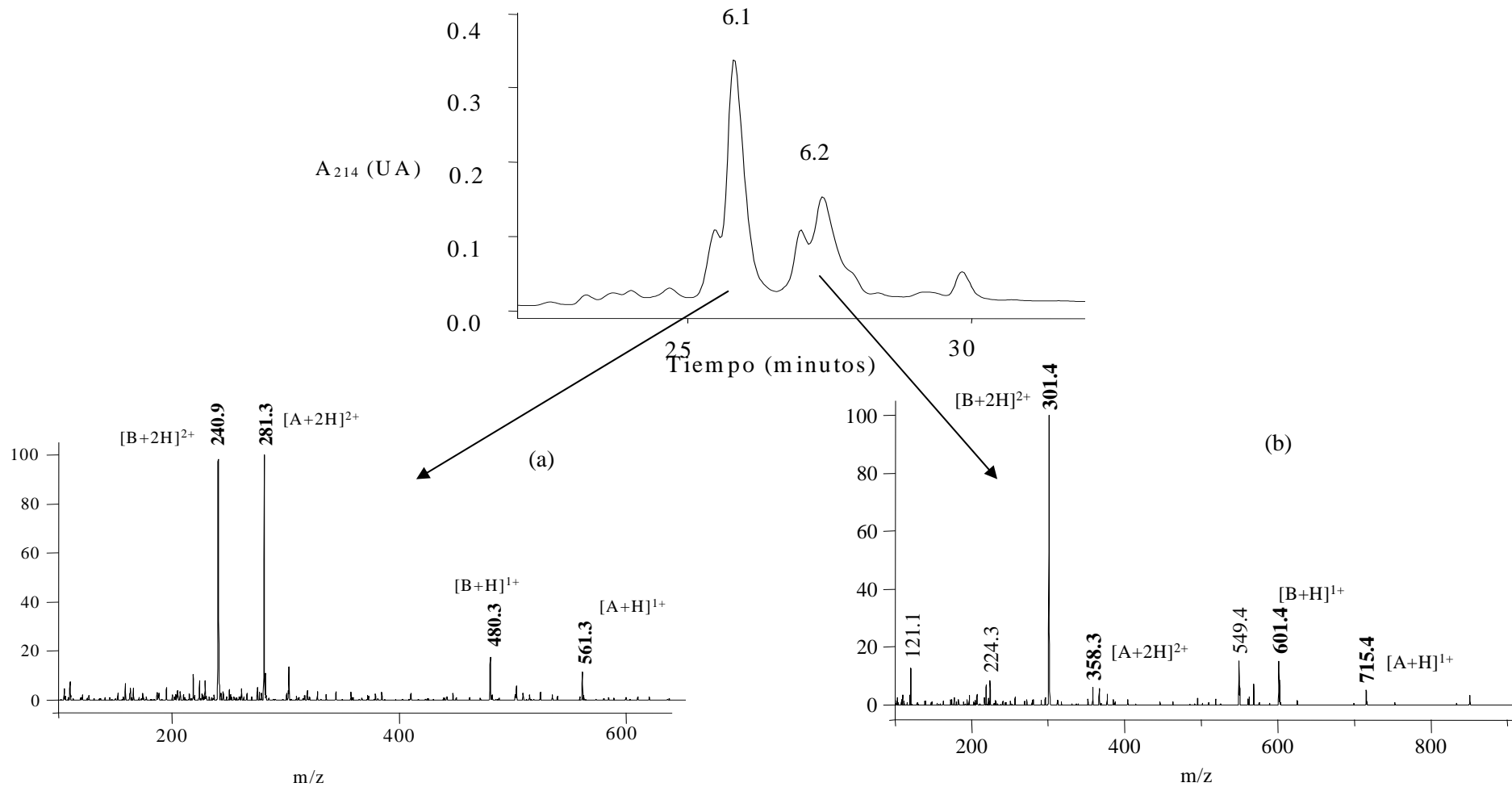


**Figura 15.** Actividad inhibitoria de la ACE (%) de las fracciones recogidas a partir del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg caprina de suero ácido por la termolisina a las 24 horas de incubación

Las fracciones 1, 6, 7, 8+9, 14 y 15 presentaron porcentajes de inhibición superiores al 50%. En el resto de las fracciones recogidas el porcentaje de inhibición fue inferior al 50%, no detectándose actividad en la fracción 4. Tras estos resultados, fueron seleccionadas las fracciones 1, 6, 7, 8+9, 13, 14 y 15 para llevar a cabo la identificación de los péptidos responsables de la actividad inhibitoria de la ACE detectada en dichas fracciones. Para ello, fue necesaria una nueva etapa cromatográfica de purificación, en la cual las fracciones fueron inyectadas en la columna de RP-HPLC, empleando las mismas condiciones, excepto el gradiente del solvente B en A, que fue de menor pendiente. Los perfiles peptídicos de las fracciones 1 y 8+9 revelaron la presencia de una compleja mezcla de péptidos.

La fracción 6 se resolvió en dos fracciones mayoritarias y bien diferenciadas (6.1 y 6.2), que se recolectaron para su posterior identificación, mediante MS y secuenciación de aminoácidos, análisis que se llevaron a cabo siguiendo los métodos detallados en el apartado 2.1.5.3. El perfil cromatográfico de la fracción 6 y los espectros de iones totales de ambas subfracciones se muestran en la Figura 16. En la subfracción 6.1 se identificaron dos iones moleculares, 480,3 y 561,3, ambos con carga +1, observándose los correspondientes iones con carga +2, 240,9 y 281,3, respectivamente. La secuenciación en dos ciclos de esta subfracción puso de manifiesto la presencia de dos péptidos, lo que confirmó los resultados obtenidos mediante MS. En el primer ciclo, correspondiente al aminoácido N-terminal, se observó la existencia de dos aminoácidos, Val y Phe. En el segundo ciclo, los picos correspondieron a Asp y Tyr. Teniendo en cuenta la masa molecular obtenida mediante MS, los péptidos presentes en esta subfracción fueron VDKEA, fragmento f(128-132) y FDKA, fragmento f(136-139). Al analizar la subfracción 6.2 mediante secuenciación, se observó en el primer ciclo, correspondiente al extremo N-terminal, tres aminoácidos, Glu, Val y Leu. En el segundo ciclo aparecieron 4 picos, correspondientes a los aminoácidos Asn, Thr, Glu y Arg. En el análisis por MS aparecieron dos iones moleculares mayoritarios, 715,4 y 601,4, de carga +1 y sus correspondientes iones con carga +2. Teniendo en cuenta la secuencia de la proteína y las posibles combinaciones, los iones identificados corresponderían a los péptidos VRTPE, fragmento f(123-127) y VEELKP, fragmento f(43-48). El resto de aminoácidos identificados podrían formar parte de péptidos minoritarios.





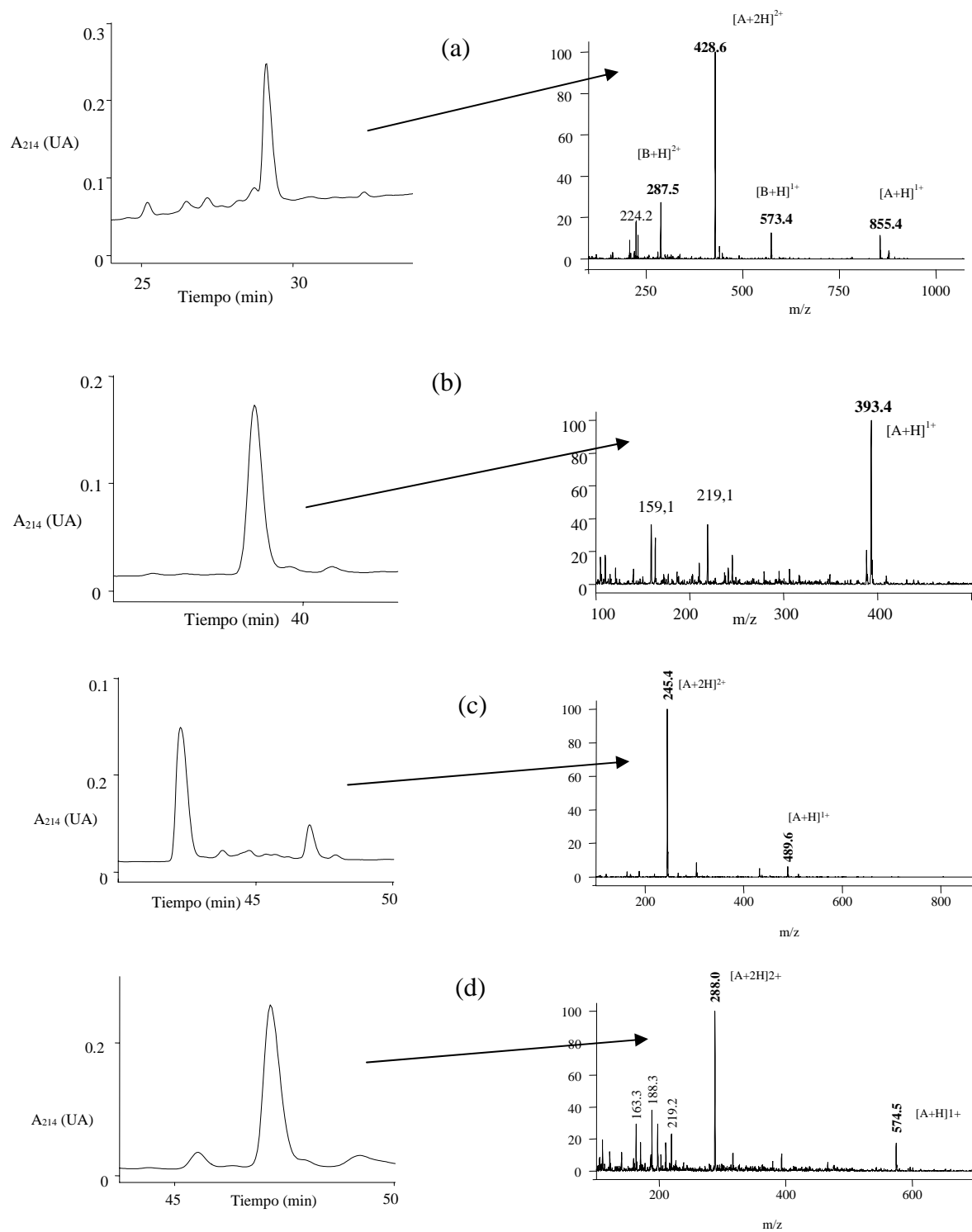
**Figura 16.** Cromatograma (RP-HPLC) de la fracción 6 y cromatograma de iones totales (MS) de las fracciones (a) 6.1 y (b) 6.2, obtenidas a partir del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg caprina por la termolisina a las 24 horas de incubación

Los cromatogramas y los espectros de iones totales de las fracciones 7, 13, 14 y 15 se muestran en la Figura 17. Estas fracciones se resolvieron en el análisis cromatográfico como un componente mayoritario, que fue recogido para su posterior identificación y uno o dos componentes minoritarios, que fueron descartados. La identificación de los péptidos se llevó a cabo de manera similar a la fracción 6, detectándose en la fracción 7 dos iones moleculares, 855,4 y 573,4, con carga +1 y sus correspondientes iones con carga +2. Tras los resultados obtenidos mediante la secuenciación de aminoácidos se identificaron los péptidos presentes en esta fracción, el fragmento f(46-53) de secuencia LKPTPEGN y el fragmento f(71-75) de secuencia IIAEK, respectivamente.

En la fracción 13 se detectó un único ión molecular de 393,4. En los dos primeros ciclos de la secuenciación se identificaron los aminoácidos Leu y Thr, por lo que teniendo en cuenta la secuencia aminoacídica de la  $\beta$ -Lg caprina, el péptido presente en esta fracción fue LLF, fragmento f(102-105). La Thr detectada podría formar parte de un péptido minoritario de esta fracción.

Por la secuenciación de aminoácidos, en la fracción 14 se identificó como aminoácido del extremo amino terminal el aminoácido Val y el aminoácido Leu en la posición vecina a este extremo. Teniendo en cuenta el ión molecular detectado por MS de 489,6, el péptido presente en esta fracción fue LVRT, fragmento f(122-125).

En la fracción 15 el ión molecular detectado fue de 574,5, con carga +1, que correspondió al péptido LQKW, fragmento f(58-61) de la  $\beta$ -Lg caprina.



**Figura 17.** Cromatogramas (RP-HPLC) y espectros de masas de las fracciones a) 7, b) 13, c) 14 y d) 15, obtenidas a partir del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg caprina por la termolisina a las 24 horas de incubación

Los péptidos identificados en las fracciones 7, 13, 14 y 15 fueron sintetizados químicamente, de acuerdo al método descrito en el apartado 2.1.5.4., determinándose en cada uno de ellos el valor del IC<sub>50</sub>. La secuencia aminoacídica, la concentración proteica de cada péptido recogido en las distintas fracciones, determinada mediante el método del BCA, el porcentaje de inhibición de la ACE y el valor del IC<sub>50</sub> se detallan en la Tabla 16.

La fracción 6, resuelta en dos subfracciones y cada una de ellas con dos péptidos, presentó un porcentaje de actividad inhibitoria de la ACE del 65,7% y una concentración proteica de 189,2 µg/mL. No fue posible determinar cuál de los péptidos constituyentes de esta fracción era el responsable de la actividad. Teniendo en cuenta la relación estructura/actividad de los péptidos descritos hasta la actualidad como inhibidores de la ACE, se puede determinar la ausencia de actividad del péptido VRTPE, ya que los péptidos con aminoácidos dicarboxílicos en el extremo C-terminal (Asp o Glu) o con Pro en la penúltima posición se unen de manera muy débil al sitio activo de la ACE (Cheung y col., 1980). Sin embargo, la secuencia f(43-48), que posee como secuencia C-terminal el tri-péptido LKP, podría contribuir a la actividad inhibitoria de la ACE observada en esta fracción. Rohrbach y col., (1981) han demostrado, empleando péptidos sintéticos, que la presencia de Pro como aminoácido C-terminal o un aminoácido con una carga positiva en la penúltima posición, ejercen una influencia positiva en la unión del sustrato y la enzima.

Las fracciones 7, 13, 14 y 15 contenían un componente mayoritario cada una de ellas y mostraron porcentajes de inhibición de la ACE entre el 45,2 y el 75%, con concentraciones peptídicas entre 13,6 y 372 µg/mL. El péptido LVRT, fragmento f(122-125) identificado en la fracción 14 presentó un valor muy elevado de IC<sub>50</sub>. Esta baja actividad pudo deberse a la presencia de Thr en la posición carboxilo terminal. El IC<sub>50</sub> del octa-péptido presente en la fracción 7 no pudo ser calculado porque el máximo porcentaje de inhibición mostrado a todas las concentraciones peptídicas ensayadas fue del 45-47%. La baja actividad detectada pudo deberse a la secuencia del extremo C-terminal constituida por Glu, Gly y Asn, que no favorece la unión y consecuente inhibición de la ACE.

El valor del IC<sub>50</sub> de los péptidos LLF y LQKW, identificados en las fracciones 13 y 15, fueron muy bajos, de 59,53 y 34,7 µM, respectivamente. La presencia de aminoácidos aromáticos, fundamentalmente Trp, en el extremo C-terminal favoreció la fijación y

**Tabla 16.** Masa molecular, fragmento, secuencia peptídica, concentración peptídica, actividad inhibitoria de la ACE (%) e IC<sub>50</sub> de los péptidos aislados del hidrolizado de la β-Lg caprina por la termolisina a las 24 horas de incubación

Nº Fracción	Masa observada	Masa calculada <sup>a</sup>	Fragmento	Secuencia peptídica <sup>b</sup>	Concentración peptídica (µg/mL)	Inhibición de la ACE (%) <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> (µM)
6					189,2	65,7	nd
6 (6.1)	479	479,2	136-139	FDKA			
	560	560,3	128-132	VDKEA			
6 (6.2)	714	713,4	43-48	VEELKP			
	600	600,3	123-127	VRTPE			
7	854	854,4	46-53	LKPTPEGN	372,0	51,0	>2700
13	392	391,3	103-105	LLF	13,6	45,2	79,88
14	488	487,3	122-125	LVRT	85,6	53,1	2470
15	573	573,3	58-61	LQKW	133,1	75,0	34,7

<sup>a</sup> Valores de masa media

<sup>b</sup> Secuencia de la β-Lg caprina de acuerdo a Preaux y col., (1979)

<sup>c</sup> Cada valor corresponde a la media de tres determinaciones

nd: valor no determinado

posterior inhibición de la ACE (Cheung y col., 1980). Estos autores habían descrito valores de IC<sub>50</sub> para los di-péptidos RW e IF de 16 y 930 μM, respectivamente. Aunque la contribución de los aminoácidos en la posición C-terminal de los di-péptidos con actividad inhibitoria de la ACE no puede extrapolarse a péptidos de mayor tamaño, en nuestro estudio y teniendo en cuenta la concentración proteica, el fragmento de la β-Lg caprina más potente corresponde al identificado en la fracción 13, f(103-105), cuya secuencia final fue LF. Este tri-péptido constituye el extremo C-terminal de la β-lactofina, descrita por Mullally y col., (1996) como inhibidor de la ACE y por Chiba y Yoshikawa, (1986) como agonista opiáceo. Este péptido es de gran interés ya que se encuentra en una “zona estratégica” de la β-Lg, parcialmente protegida de la hidrólisis digestiva, por lo que tras su absorción podría ejercer efectos sistémicos sobre la ACE. De manera similar, el di-péptido KW había sido identificado en un hidrolizado del músculo de sardina, mostrando alta actividad inhibitoria de la ACE (Matsufuji y col., 1994).

En la Figura 18 se muestra la secuencia aminoacídica de la β-Lg caprina, marcando en color rojo los péptidos inhibidores de la ACE, aislados y caracterizados en este estudio. Además, con un recuadro azul se detallan los fragmentos caracterizados en la bibliografía como inhibidores de la ACE, derivados de la β-Lg bovina y que coinciden con las regiones caracterizadas en nuestro estudio.

I IVTQTMKGLDIQKVAGTWY<sup>20</sup> SLAMAASDISLLDAQSAPLR<sup>40</sup> VY **VEELKP TPEGN** LEIL **LQK<sup>60</sup>W**

ENDECAQKK **IAEK** TKIPA<sup>80</sup> VFKIDALNENKVLVLDTDYK<sup>100</sup> **KY LLF** CMENSAEPEQSLACQ<sup>120</sup>

**CL VRTPE VDKEA** LEK **FDKA** L<sup>140</sup> KALPMHIRLAFNPTQLEGQC<sup>160</sup> HV<sup>162</sup>

**Figura 18.** Secuencia aminoacídica de la  $\beta$ -Lg caprina. En rojo se destacan los péptidos bioactivos caracterizados en nuestro estudio y con un recuadro azul aquellos péptidos descritos en la bibliografía.

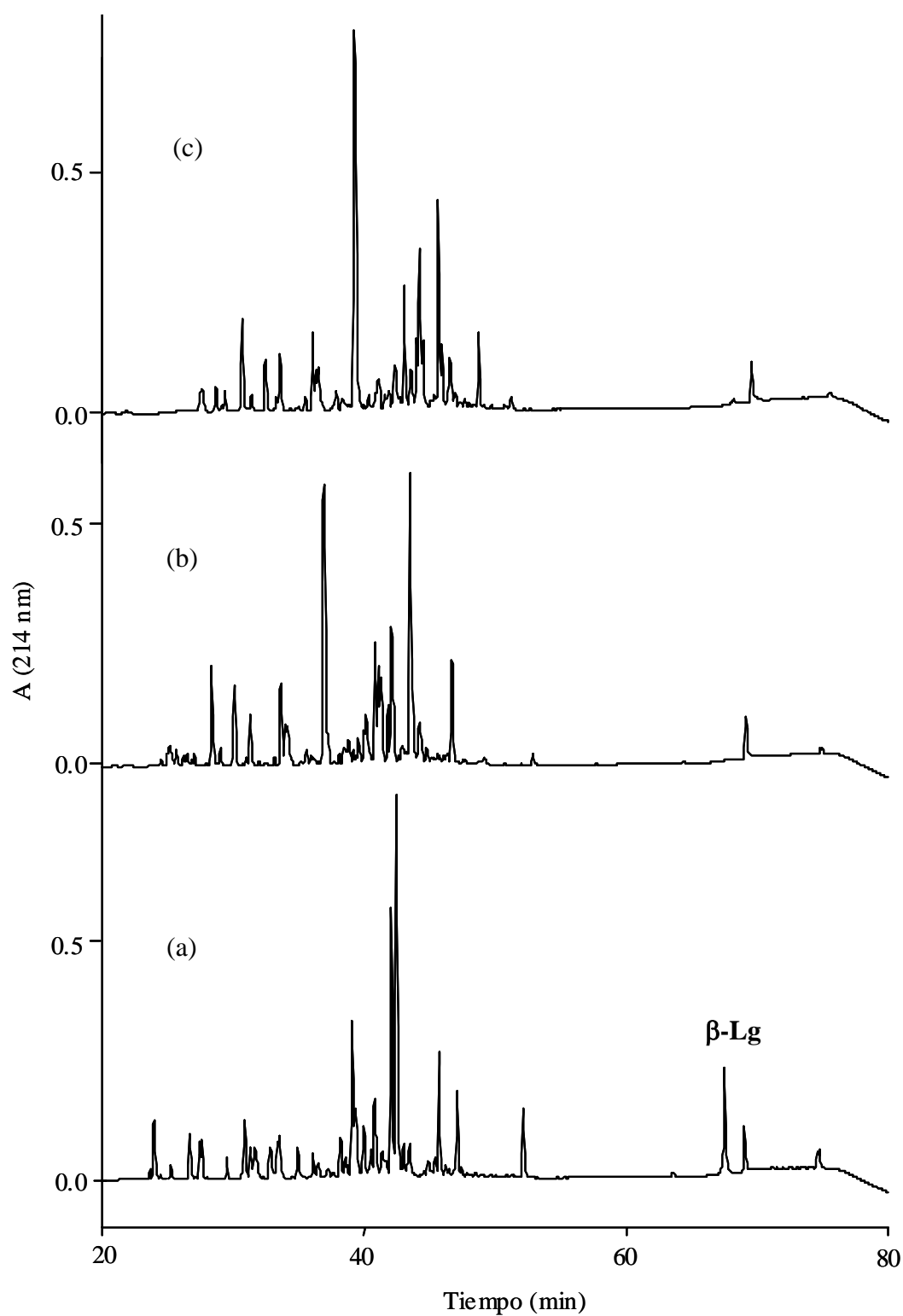
### **3.2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA $\beta$ -LG BOVINA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES**

Dado que el proceso de desnaturalización térmica de la  $\beta$ -Lg puede favorecer la exposición de enlaces peptídicos ocultos en la conformación nativa de la proteína, el objetivo de esta parte del trabajo fue comprobar si este efecto desnaturalizante podría afectar a la susceptibilidad de dicha proteína a la acción de la termolisina, dando lugar a nuevos fragmentos peptídicos que no se obtendrían en condiciones nativas. Además, se quiso estudiar si la formación de nuevos fragmentos tras la hidrólisis con esta enzima microbiana podría influir en la actividad inhibitoria de la ACE del hidrolizado.

Para cumplir este objetivo, se llevó a cabo la hidrólisis de la  $\beta$ -Lg con la termolisina durante 4 horas a distintas temperaturas de incubación, desde 37 a 80°C. La termolisina es una metaloenzima termoestable (Endo, 1962) cuya actividad se mantiene a 80°C (Neurath, 1989). Esta característica de termorresistencia permitió realizar este estudio sobre el efecto de la temperatura en la hidrólisis de la  $\beta$ -Lg bovina con dicha enzima. El estudio de los perfiles peptídicos de los hidrolizados se llevó a cabo mediante RP-HPLC, acoplando esta técnica a MS para caracterizar los péptidos presentes en dichos hidrolizados (apartado 2.2.2.).

Inicialmente, se quiso estudiar el efecto de la termolisina sobre la  $\beta$ -Lg A bovina, en función del tiempo de incubación. Así, en la Figura 19 se muestran los perfiles cromatográficos de los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg A bovina por la termolisina a 37°C durante 30 minutos, 2 y 4 horas de incubación. El pico correspondiente a la  $\beta$ -Lg A apareció en el cromatograma con un tiempo de retención de 70 minutos. Tras los primeros 30 minutos de hidrólisis, la proteína se había hidrolizado parcialmente, pudiéndose observar el pico de esta proteína en el cromatograma. Los péptidos derivados de la hidrólisis presentaron tiempos de retención entre 25 y 50 minutos. A las 2 horas de incubación, la  $\beta$ -Lg había desaparecido prácticamente en su totalidad. Sin embargo, Schmidt y Poll, (1991) habían observado la hidrólisis total de la  $\beta$ -Lg bovina tras 8 horas de incubación a esta temperatura. La mayor velocidad de hidrólisis pudo deberse a la mayor relación





**Figura 19.** Cromatogramas de los hidrolizados de  $\beta$ -Lg A bovina por la termolisina a  $37^{\circ}\text{C}$  durante (a) 30 min, (b) 2 horas y (c) 4 horas, obtenidos por RP-HPLC

enzima/sustrato empleada en nuestro estudio (5/100, p/p) en comparación con la empleada por estos autores (1/100, p/p). Además, la termolisina podría actuar en mayor medida sobre la variante A con respecto a la combinación de las variantes A y B, al igual que se produce con otras enzimas, como la tripsina, quimotripsina y la papaína (Van Willige y Fitzgerald, 1995; Schmidt y van Markjwick, 1991).

El perfil peptídico del hidrolizado a las 2 horas se había modificado con respecto al obtenido tras 30 minutos de incubación, observándose un incremento en la señal de absorbancia de los péptidos de mayor hidrofilia, con tiempos de retención entre 25 y 40 minutos. Sin embargo, los cambios en el perfil cromatográfico del hidrolizado a las 4 horas de incubación con la termolisina fueron menos importantes.

A 50°C, la incubación durante 30 minutos fue suficiente para hidrolizar totalmente la  $\beta$ -Lg bovina. Al igual que con la hidrólisis a 37°C, Schmidt y Poll, (1991) habían observado la hidrólisis total de esta proteína a 50°C tras un período de incubación mayor. La desaparición total de la  $\beta$ -Lg bovina tras 30 minutos de incubación también se observó en los cromatogramas correspondientes a los hidrolizados obtenidos a 60 y 80°C. Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Schmidt y Poll, (1991), que habían observado mediante SDS-PAGE la hidrólisis de la  $\beta$ -Lg bovina y la liberación de péptidos de pequeño tamaño al incubar la proteína a 70°C durante 20 minutos. Los péptidos liberados tras los primeros 30 minutos de incubación con la termolisina a 50, 60 y 80°C presentaron tiempos de retención en el intervalo entre 25 y 50 minutos. Sin embargo, los cromatogramas fueron diferentes al obtenido para el hidrolizado a 37°C. El perfil peptídico varió a las 2 horas, liberándose péptidos de mayor hidrofilia, presentando mayor señal de absorbancia aquellos con tiempos de retención entre 25 y 40 minutos.

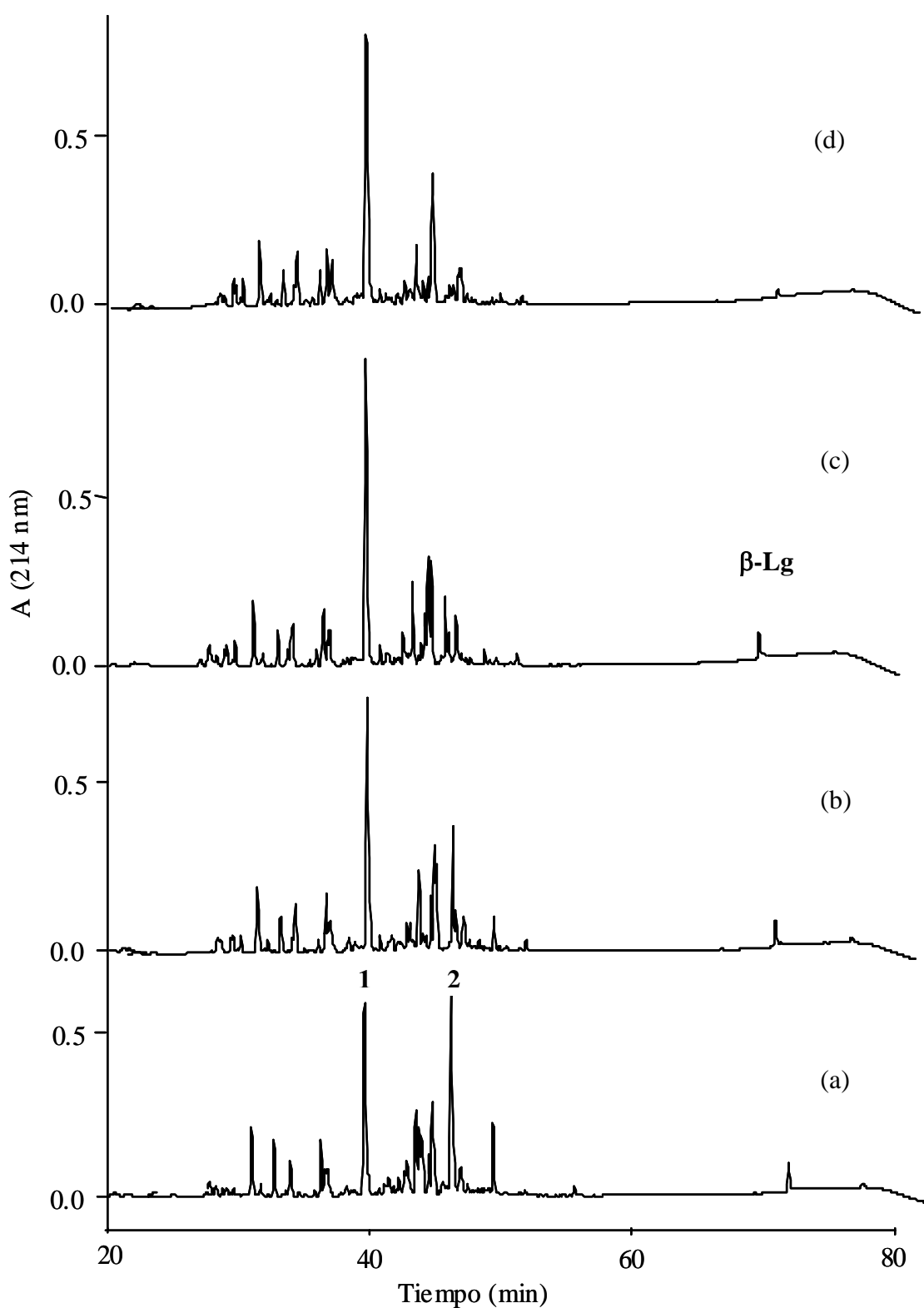
De manera similar a lo observado a 37°C, el cambio en el perfil cromatográfico del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg bovina a 50°C durante 4 horas fue menos acusado. Esto pudo deberse a que el proceso de desnaturalización térmica de la  $\beta$ -Lg provocado por esta temperatura no fue suficiente para permitir la aparición de enlaces susceptibles a la acción de la termolisina. Hambling y col., (1992) habían descrito la disociación del dímero a monómero a temperaturas en el intervalo entre 30 y 55°C, requiriéndose temperaturas superiores para la aparición de grupos activos en la proteína. Así, a 60°C y 80°C pudieron

observarse cambios entre los perfiles peptídicos de los hidrolizados obtenidos tras 2 y 4 horas de acción de la enzima, lo que pudo ser debido a la desnaturalización de la  $\beta$ -Lg bovina a esta temperatura y la consecuente aparición de enlaces susceptibles a la hidrólisis por la termolisina y ocultos en la estructura nativa de la proteína. La presencia en la  $\beta$ -Lg bovina nativa de enlaces teóricamente susceptibles pero inaccesibles a la acción de enzimas, como la pepsina y la quimotripsina había sido descrito por Reddy y col., (1988).

Con el objetivo de observar las diferencias entre los perfiles peptídicos de los hidrolizados obtenidos a las distintas temperaturas y a un mismo tiempo, se seleccionaron los cromatogramas correspondientes a las 2 horas de incubación de la  $\beta$ -Lg A bovina con la termolisina (Figura 20). A este tiempo la proteína había desaparecido prácticamente en su totalidad a las cuatro temperaturas estudiadas y el perfil peptídico era diferente con respecto al del hidrolizado a los 30 minutos de hidrólisis pero de bastante semejanza con el del hidrolizado a las 4 horas de incubación.

Los péptidos derivados de la hidrólisis de la proteína presentaron tiempos de retención en el intervalo entre 25 y 50 minutos, poniéndose de manifiesto diferencias tanto cualitativas como cuantitativas entre los distintos perfiles. Las diferencias en la señal de absorbancia fueron notables para los picos enumerados en el cromatograma como 1 y 2, que presentaron tiempos de retención de 40 y 45 minutos, respectivamente. La señal del pico 1 fue menos intensa en el cromatograma del hidrolizado a 37°C, aumentando su intensidad con la temperatura de incubación. Esto pudo ser debido al mayor grado de hidrólisis de la  $\beta$ -Lg bovina al incrementar la temperatura de incubación con la termolisina. Por el contrario, el pico enumerado como pico 2 presentó una señal de absorbancia muy intensa en el cromatograma del hidrolizado a 37°C, disminuyendo esta señal a medida que la hidrólisis se llevó a cabo a mayor temperatura, desapareciendo casi en su totalidad en el cromatograma del hidrolizado a 80°C.

El estudio más exhaustivo de las diferencias en la concentración de los fragmentos presentes en los hidrolizados, así como la identificación de los péptidos cuya liberación fuera dependiente de la temperatura y del tiempo de incubación de la  $\beta$ -Lg bovina con la termolisina se llevaron a cabo mediante HPLC-ESI-MS, mostrándose los resultados en el siguiente apartado.

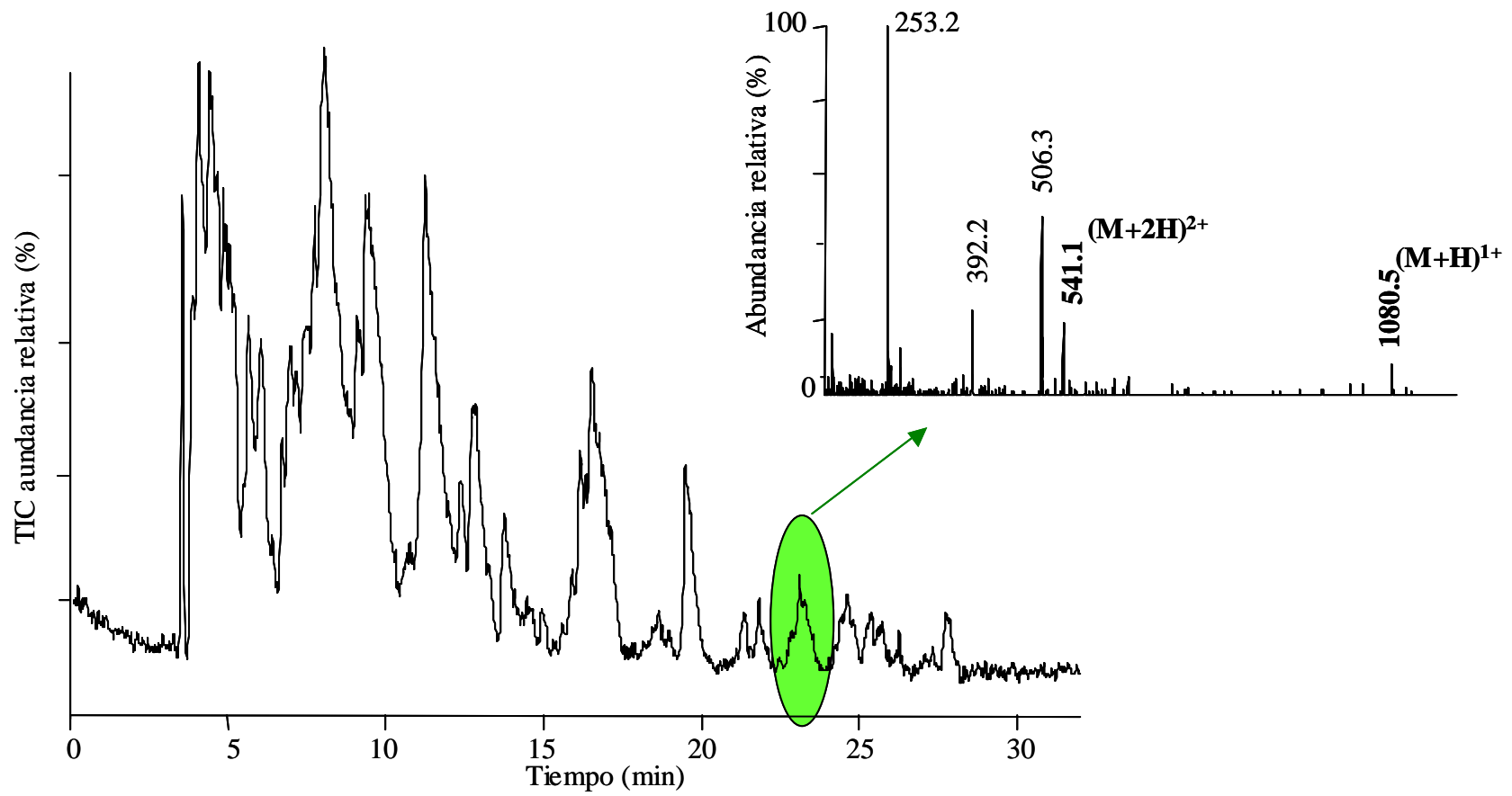


**Figura 20.** Cromatogramas de los hidrolizados de  $\beta$ -Lg A bovina por la termolisina durante 2 horas a (a) 37°C, (b) 50°C, (c) 60°C y (d) 80°C, obtenidos por RP-HPLC

### 3.2.1. Caracterización de los hidrolizados mediante HPLC-ESI-MS

La caracterización de los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg A bovina por la termolisina a las distintas temperaturas y tiempos de incubación se llevó a cabo mediante HPLC-ESI-MS, de acuerdo al método detallado en el apartado 2.2.2. Mediante este estudio se pudieron identificar las diferencias tanto cualitativas como cuantitativas existentes entre dichos hidrolizados, en función de la temperatura y del tiempo de acción de la enzima sobre la proteína. Se quiso comprobar si durante la incubación de la  $\beta$ -Lg con la termolisina a temperaturas elevadas, la desnaturalización térmica de la proteína y la aparición consecuente de enlaces accesibles a la acción de la enzima permitieron la liberación de nuevos fragmentos. Además, estos nuevos péptidos podrían influir sobre la actividad inhibitoria de la ACE descrita para hidrolizados microbianos de la  $\beta$ -Lg.

Tras el estudio de los hidrolizados por HPLC-ESI-MS pudo demostrarse la presencia de péptidos, liberados sólo a temperaturas iguales o superiores a los 50°C tras cortos tiempos de incubación, o bien liberados a 37°C, necesitándose a esta temperatura un período de reacción de la proteína con la enzima mayor. En la Figura 21 se muestra el espectro de masas del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg por la termolisina a 60°C durante 2 horas, así como el cromatograma de iones totales de una de las fracciones constituidas por péptidos determinantes de este tipo de diferencia cualitativa entre los hidrolizados a las distintas temperaturas. El ión detectado era de 1080,5, apareciendo también el consecuente ión con carga +2 (541,2). El péptido correspondiente a este ión no apareció a 37°C durante todo el proceso de hidrólisis. Sin embargo, fueron necesarias 4 horas para liberarse a 50°C y sólo 30 minutos a 60 y 80°C. Por lo tanto, se pudo comprobar que la desnaturalización de la  $\beta$ -Lg provocada por altas temperaturas permitió la aparición de enlaces susceptibles a la termolisina y ocultos en la estructura nativa de la proteína y la consecuente formación de nuevos péptidos. La aparición de grupos activos, ocultos en la estructura nativa de la  $\beta$ -Lg, tras la desnaturalización de la proteína y la reacción de dichos grupos con los centros activos de otros compuestos había sido descrito por Sawyer, (1968) y Chaplin y Lister, (1986). El empleo de una base de datos, con una tolerancia del 0,1%, permitió la identificación de la secuencia peptídica correspondiente al ión detectado, que fue DDEALEKFD, fragmento f(129-137). Se ha comprobado que este fragmento se



**Figura 21.** Espectro de masas del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg A bovina por la termolisina durante 2 horas a 60°C. El cromatograma de iones totales correspondió al pico marcado en color

encontraba en una zona de la  $\beta$ -Lg de alta resistencia a la desnaturalización, lo que confirmó la acción de la temperatura como agente desnaturalizante de la proteína.

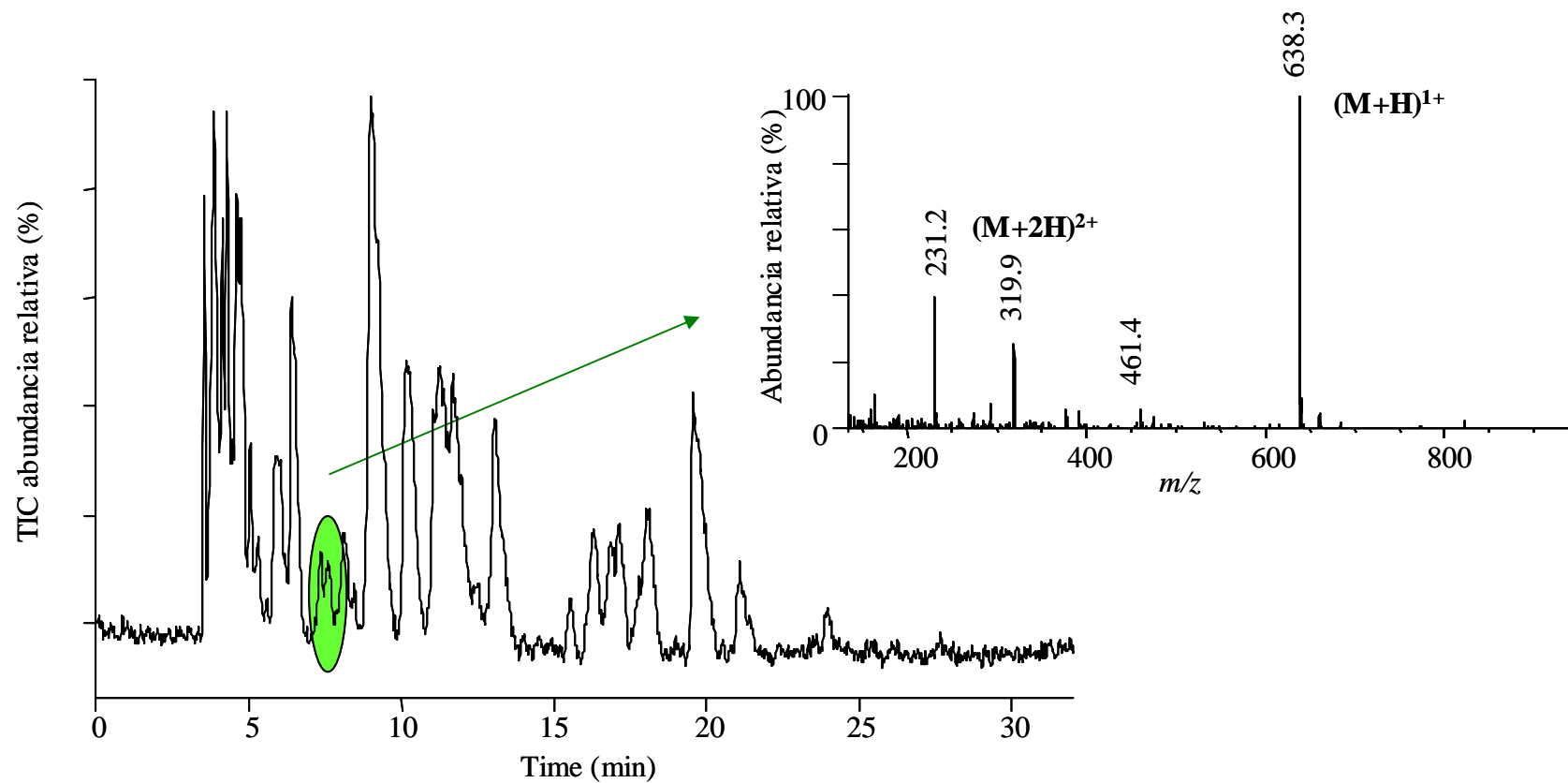
En la Tabla 17 se muestran los péptidos liberados a partir de la  $\beta$ -Lg tras la hidrólisis por termolisina a altas temperaturas e identificados en nuestro estudio, determinado el tiempo necesario para su aparición a las distintas temperaturas de incubación.

**Tabla 17.** Masa molecular, fragmento y secuencia peptídica de los péptidos identificados por HPLC-ESI-MS a partir del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg A bovina por la termolisina. Se indica el tiempo necesario para su liberación a cada una de las temperaturas de incubación (n.d. fragmento o secuencia no determinada, N.D. ión no detectado)

Masa observada	Masa calculada	Fragmento	Secuencia peptídica	37°C	50°C	60°C	80°C
1079,5	1080,5	129-137	DDEALEKFD	N.D.	4 h	30 min	30 min
598,4	599,4	54-58	LEILL	N.D.	30 min	30 min	30 min
795,4	796,4	16-22	AGTWYSL	N.D.	30 min	30 min	N.D.
786,4	n.d.	n.d.	n.d.	2 h	30 min	30 min	30 min

Además, mediante este análisis de los hidrolizados se identificaron péptidos derivados de la  $\beta$ -Lg, cuyo grado de hidrólisis por la termolisina fue mayor cuando la reacción tuvo lugar a temperaturas elevadas. Esto pudo ser debido a la mayor actividad proteolítica ejercida por la enzima a temperaturas elevadas, lo que pudo favorecer la hidrólisis más rápida tanto de la  $\beta$ -Lg bovina como de los fragmentos liberados en los primeros estadios de la reacción.

En la Figura 22 se muestra el espectro de masas del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg por la temolisina a 37°C durante 30 minutos, así como el cromatograma de iones totales de uno de los picos constituyentes del hidrolizado. Pudo observarse la presencia del ión molecular



**Figura 22.** Espectro de masas del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg A bovina por la termolisina durante 30 minutos a 37°C. El cromatograma de iones totales correspondió al pico marcado en color



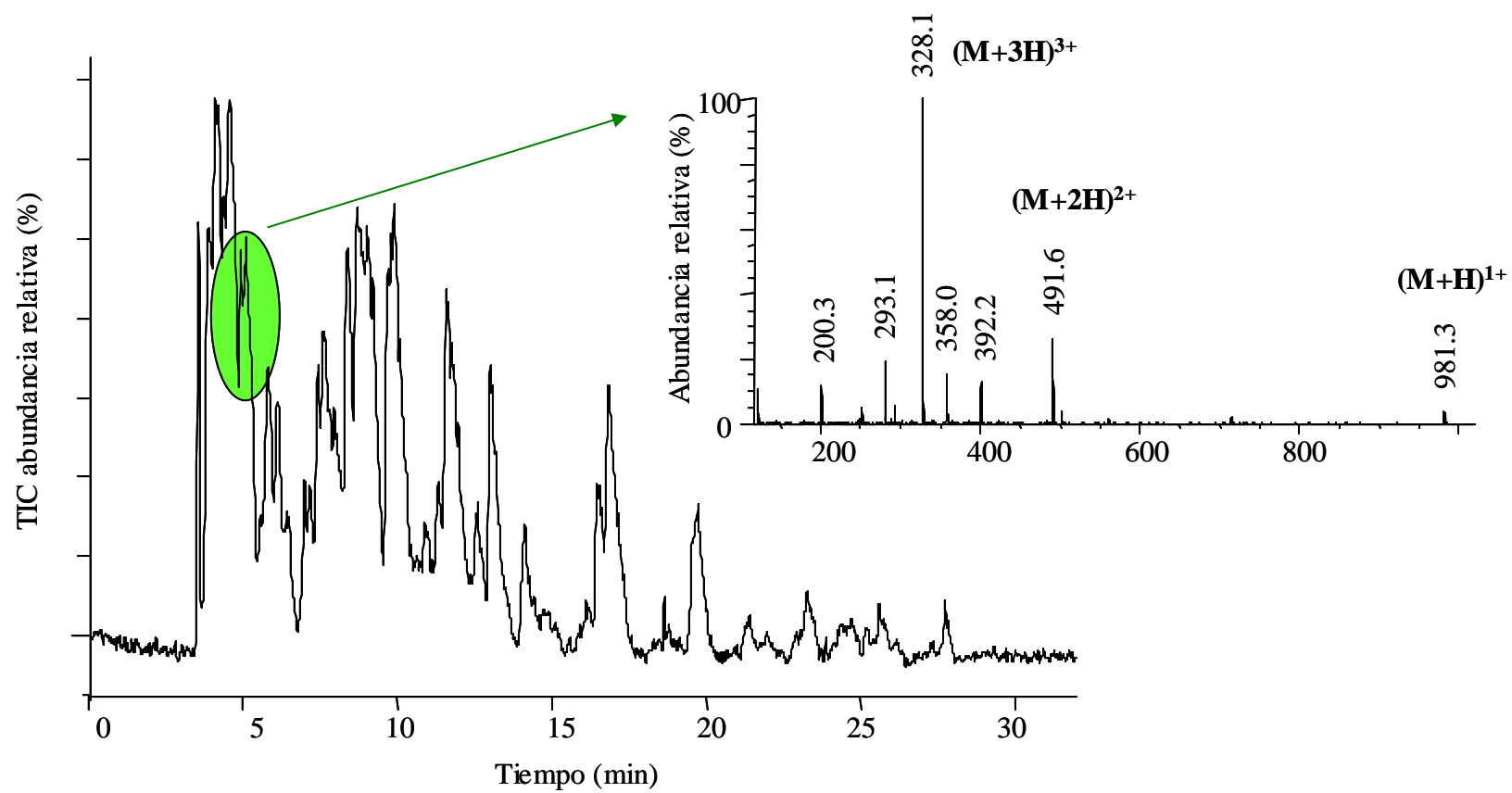
de 638,3 y el correspondiente ión con carga +2 (319,9), que correspondió al péptido VYVEE, fragmento f(41-45) de la  $\beta$ -Lg A bovina. Fueron necesarias 4 horas de incubación a 37°C para la desaparición total de este péptido, 2 horas si la incubación se realizó a 50 y 60°C y no se observó el ión correspondiente a este péptido en el hidrolizado a los 30 minutos de reacción de la  $\beta$ -Lg bovina con la termolisina a 80°C.

La mayor velocidad de acción de la termolisina a temperaturas elevadas también se observó para otros péptidos, cuya secuencia y tiempo de hidrólisis se muestran en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Masa molecular, fragmento y secuencia peptídica de los péptidos identificados por HPLC-ESI-MS a partir del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg A bovina por la termolisina. Se indica el tiempo transcurrido para su hidrólisis y desaparición total en el cromatograma en función de la temperatura de incubación (n.d. fragmento o secuencia no determinada)

Masa observada	Masa calculada	Fragmento	Secuencia peptídica	37°C	50°C	60°C	80°C
637,3	637,3	41-45	VYVEE	4 h	2 h	2 h	< 30 min
685,7	685,4	91-96	KVLVLD	2 h	< 30 min	< 30 min	< 30 min
867,4	867,4	16-23	AGTWYSLA	4 h	2 h	2h	< 30 min
1182,9	n.d.	n.d.	n.d.	> 4 h	2 h	2 h	2 h
1323,6	1322,6	98-107	DYKKLLFCM	4 h	2 h	2h	< 30 min
1350,5	n.d.	n.d.	n.d.	> 4 h	2 h	2h	2h
1613,6	1612,8	122-135	LVRTPEVDD- EALEK	4 h	2 h	< 30 min	< 30 min

Finalmente, pudieron observarse diferencias cuantitativas en diversos fragmentos peptídicos liberados tras acción de la termolisina sobre la  $\beta$ -Lg A bovina, en función de la temperatura de incubación. En la Figura 23 se muestra el espectro de masas del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg a las 2 horas de incubación a 60°C, así como el cromatograma de iones totales



**Figura 23.** Espectro de masas del hidrolizado de la  $\beta$ -Lg A bovina por la termolisina durante 2 horas a  $60^{\circ}\text{C}$ . El cromatograma de iones totales correspondió al pico marcado en color

de uno de los picos constituidos por péptidos presentes en cantidades variables en función de la temperatura de reacción. Se observó el ión molecular 981,3, con carga +1 y los correspondientes iones con carga +2 (491,6) y +3 (328,1). Empleando la base de datos pudo identificarse el péptido correspondiente a este ión, que fue el fragmento f(94-101), de secuencia VLDTDYKK.

Otros fragmentos liberados tras la hidrólisis de la  $\beta$ -Lg bovina por la termolisina y presentes en concentraciones diferentes en función de la temperatura de incubación y que han sido identificados en nuestro estudio fueron los péptidos QKWENGE, fragmento f(59-65) e IRL, correspondiente al fragmento f(147-149).

Una vez determinadas las diferencias en la hidrólisis de la  $\beta$ -Lg por la termolisina en función de la temperatura de incubación, quiso comprobarse si dichas diferencias influían en la actividad inhibitoria de la ACE de los hidrolizados. Para ello, se determinó el porcentaje de inhibición de la ACE en los hidrolizados de la  $\beta$ -Lg A bovina por la termolisina a los 30 minutos y las distintas temperaturas de incubación. Estos porcentajes fueron similares en los cuatro hidrolizados estudiados y superiores al 90%. Esta semejanza en los resultados pudo ser debida, bien a la presencia de los péptidos responsables de la actividad en todos los hidrolizados, independientemente de la temperatura de reacción o bien al equilibrio entre los péptidos bioactivos formados e hidrolizados tras la incubación a temperaturas crecientes. Algunos de los péptidos liberados tras la acción de la termolisina e identificados mediante HPLC-ESI-MS presentaron una secuencia peptídica determinante en la actividad inhibitoria de la ACE, por lo que podrían contribuir a la actividad detectada en los hidrolizados. Este es el caso del péptido IRL, correspondiente al fragmento f(147-149) de la  $\beta$ -Lg, y presente en concentraciones diferentes en función de la temperatura de incubación. Este péptido contiene la secuencia f(148-149) que había sido descrita por Mullally y col., (1996) como inhibidor de la ACE.

Podemos concluir que, tras este estudio, se ha confirmado la capacidad de la temperatura para provocar la desnaturalización de la  $\beta$ -Lg, favoreciendo, además de cambios en las propiedades funcionales de esta proteína, la exposición de enlaces peptídicos que habían estado ocultos en la estructura nativa de la proteína. Estos enlaces pueden reaccionar con el centro activo de enzimas, como la termolisina y favorecer la

liberación de nuevos péptidos, los cuales podrían influir en la actividad biológica de los hidrolizados obtenidos a partir de esta proteína. Este mecanismo térmico de desnaturalización, junto a las altas presiones podrían emplearse, por tanto, como estrategias en la búsqueda de nuevos fragmentos con actividad inhibitoria de la ACE derivados de las proteínas de suero, lo que incrementaría el valor biológico y nutricional de dicho suero.

### **3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ACE EN PRODUCTOS LÁCTEOS COMERCIALES**

En esta parte del trabajo se ha llevado a cabo la determinación de la actividad inhibitoria de la ACE en muestras de leche y distintos productos lácteos comerciales, leches fermentadas y maternizadas, quesos frescos y mousses de quesos frescos. Además se han aislado y caracterizado las fracciones peptídicas responsables de la actividad de uno de los productos lácteos analizados. Para ello, se determinó la actividad inhibitoria de la ACE y el contenido de nitrógeno proteico, amínico y peptídico en los extractos solubles en agua obtenidos a partir de estos productos.

Puesto que los péptidos inhibidores de la ACE pueden liberarse durante el proceso de digestión, o bien pueden perder su actividad tras hidrolizarse por las enzimas digestivas, en esta parte del trabajo también se ha estudiado el comportamiento de cuatro de los productos lácteos comerciales, simulando las condiciones del tracto gastrointestinal.

#### **3.3.1. Actividad inhibitoria de la ACE en leches fermentadas**

La fracción sérica de las muestras de leches fermentadas se preparó siguiendo el método descrito en el apartado 2.3.2. En esta fracción se incluyeron, además de azúcares y sales, todos los componentes nitrogenados solubles a pH 4,6, es decir, tanto las seroproteínas, como los péptidos y aminoácidos libres resultantes de la hidrólisis de las caseínas tras la acción de los fermentos lácticos. En el apartado 3.1.3. se había demostrado la ausencia de actividad en las proteínas y en los aminoácidos libres, por lo que se relacionó la actividad inhibitoria de la ACE con el nitrógeno constituyente de los péptidos, responsables éstos de dicha actividad. El valor de nitrógeno peptídico se determinó restando el valor del nitrógeno amínico, obtenido mediante el método de la ninhidrina-cadmio, al valor de nitrógeno total, determinado mediante el método Kjeldahl (apartado 2.3.3.).

Previamente y con el objetivo de confirmar la ausencia de péptidos bioactivos en los productos lácteos no fermentados se determinó la actividad inhibitoria de la ACE en el extracto soluble en agua preparado a partir de dos muestras de leche de vaca, UHT y

pasteurizada, obteniéndose actividades de inhibición de la ACE inferiores al 2%. Estos resultados confirmaron la necesidad del proceso de fermentación de la leche para la liberación de péptidos con dicha actividad.

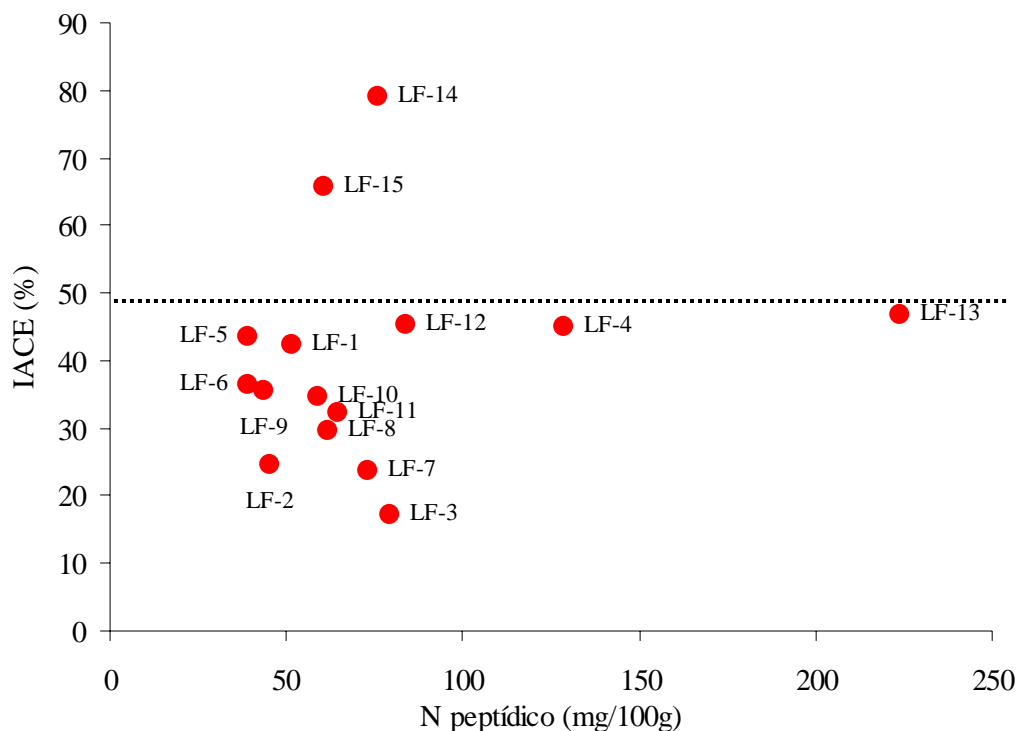
Los resultados de porcentaje de inhibición de la ACE y del contenido de nitrógeno total, amínico y peptídico del extracto soluble en agua de las muestras de los productos lácteos fermentados se muestran en la Tabla 19.

**Tabla 19.** *Actividad inhibitoria de la ACE (%), nitrógeno total, amínico y peptídico del extracto soluble en agua de los productos lácteos fermentados (LF)*

<b>Muestra</b>	<b>IACE (%)</b>	<b>N<sub>total</sub> (mg/100g)</b>	<b>N<sub>amínico</sub> (mg/100g)</b>	<b>N<sub>peptídico</sub> (mg/100g)</b>
LF-1	42,5 ± 1,0	54,0 ± 4,2	2,3 ± 0,06	51,7
LF-2	24,5 ± 0,6	46,0 ± 0,7	0,6 ± 0	45,4
LF-3	17,2 ± 0	81,0 ± 3,5	1,9 ± 0,05	79,1
LF-4	45,1 ± 1,2	130,0 ± 3,5	1,4 ± 0,04	128,6
LF-5	43,5 ± 4,4	41,0 ± 1,4	1,9 ± 0,06	39,1
LF-6	36,5 ± 5,1	40,5 ± 0,7	1,5 ± 0,01	39,0
LF-7	23,7 ± 2,9	74,0 ± 2,8	1,1 ± 0,05	72,9
LF-8	29,7 ± 2,7	63,0 ± 7,1	1,3 ± 0,04	61,7
LF-9	35,6 ± 3,9	44,5 ± 0,7	0,8 ± 0,12	43,7
LF-10	34,7 ± 3,5	60,0 ± 0,7	1,1 ± 0	58,9
LF-11	32,4 ± 2,0	66,0 ± 0	1,6 ± 0	64,4
LF-12	45,3 ± 0	85,0 ± 0,	1,1 ± 0,01	83,9
LF-13	46,9 ± 2,5	226,0 ± 10,6	2,0 ± 0,01	224,0
LF-14	79,0 ± 4,3	79,0 ± 1,4	2,8 ± 0,12	76,2
LF-15	65,8 ± 2,1	64,0 ± 0,7	3,3 ± 0	60,7

En todas las muestras se observó la presencia de actividad inhibitoria de la ACE, lo que concuerda con los resultados de otros autores, que además habían aislado y caracterizado secuencias peptídicas bioactivas procedentes de la hidrólisis de las caseínas durante la fermentación de la leche con distintas bacterias lácticas (Yamamoto y col., 1999; Gobbetti y col., 2000). Por lo tanto, se confirmó la acción sobre las proteínas lácteas del sistema proteolítico de las bacterias lácticas, liberándose péptidos y aminoácidos libres (Harwalkar y McMahon, 1993), siendo los péptidos, probablemente los de menor tamaño, los responsables de la actividad inhibitoria de la ACE observada en estos productos. Sin embargo, otros autores habían descrito la baja probabilidad de formación de péptidos bioactivos en leches fermentadas, debido al corto tiempo del proceso de fermentación (Meisel y Bockelmann, 1999). Esta variabilidad entre los resultados de los distintos autores, incluyendo los nuestros, pudo ser debida a las diferencias en las condiciones influyentes en la fermentación, como la composición del producto, las cepas implicadas en el proceso (Yamamoto, 1997; Matar y col., 1997) y las condiciones tecnológicas de dicho proceso, como el tratamiento térmico aplicado a la leche (Matar y Goulet, 1996).

La relación entre el porcentaje de inhibición de la ACE y el contenido de nitrógeno peptídico se muestra en la Figura 24. Teniendo en cuenta esta relación pudieron distinguirse tres grupos de productos lácteos fermentados. El primer grupo, constituido por las muestras LF-14 y LF-15, correspondientes a un producto tipo kefir y a un yogur natural de leche de cabra, respectivamente, presentaron valores de actividad inhibitoria de la ACE superiores al 65% y unos valores de nitrógeno peptídico normales, comprendidos entre 61 y 76 mg/100g. Estas dos muestras estaban elaboradas con leche de cabra, por lo que la mayor actividad inhibitoria de la ACE observada pudo deberse a la distinta secuencia primaria de las caseínas de origen caprino, que permitió, tras la acción de los fermentos lácticos, liberar fragmentos peptídicos de alta actividad. Se determinó el valor del IC<sub>50</sub>, expresado en  $\mu\text{g}$  de nitrógeno peptídico/mL, para estas dos muestras, que fue de 61,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el kefir y de 16,9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el yogur de cabra. El kefir es una leche fermentada ácida y moderadamente alcohólica, en la que coexisten cepas de lactobacilos, lactococos, estreptococos y levaduras (Angulo y col, 1993). Adicionalmente al origen de la leche de partida, la variedad y el número de microorganismos implicados en el proceso de fermentación de la leche durante la elaboración del kefir, pudieron favorecer la hidrólisis



**Figura 24.** Relación entre la actividad inhibitoria de la ACE (%) y el contenido de nitrógeno peptídico (mg/100 g) del extracto soluble en agua de los productos lácteos fermentados

de las caseínas y la consecuente formación de péptidos con potente actividad inhibitoria de la ACE. Estos resultados concuerdan con los de Kuwabara y col., (1995) que habían descrito la alta actividad antihipertensiva por inhibición de la ACE en un producto lácteo fermentado con varias cepas de bacterias lácticas y una cepa de levadura, asemejando el proceso de preparación del kefir. Esta actividad se adiciona a otras descritas anteriormente para esta leche fermentada, como el efecto antimicrobiano (Angulo y col., 1993) y la actividad antitumoral (Shiomi y col., 1982).

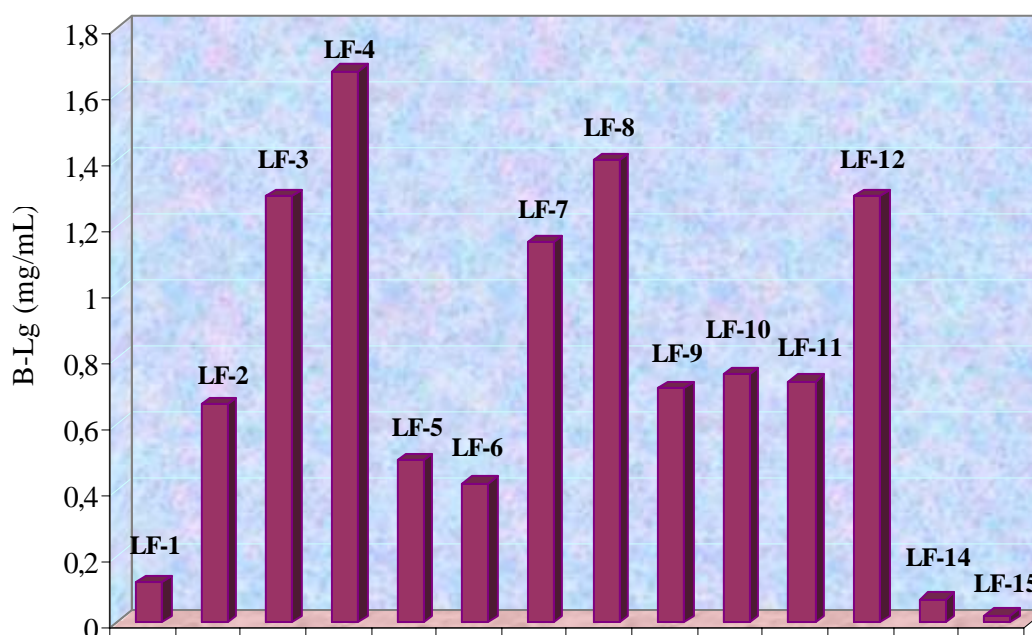
En un segundo grupo se incluyeron las muestras de los productos lácteos fermentados que presentaron valores bajos de porcentaje de inhibición de la ACE, entre el 17 y 45% y valores de nitrógeno peptídico intermedios, en el intervalo entre 39 y 84 mg/100g. Dentro de este grupo se incluyeron las muestras LF-5, LF-1, LF-6, LF-9, LF-10, LF-11, LF-8, LF-2, LF-7, LF-3 y LF-12, todas ellas elaboradas con leche de vaca. Merece



destacar dentro de este grupo, la muestra LF-5, que presentó un valor de actividad inhibitoria de la ACE alto dentro de este grupo y un valor de nitrógeno peptídico bastante bajo. Esta leche fermentada estaba elaborada con los fermentos lácticos del yogur y *Lactobacillus casei*. La mayoría de los fragmentos obtenidos por procesos fermentativos y descritos hasta la actualidad como inhibidores de la ACE proceden de la hidrólisis de la  $\beta$ -CN (Nakamura y col., 1995; Rokka y col., 1997). Como se ha comprobado que las enzimas de *Lactobacillus casei* actúan de manera prioritaria sobre la  $\beta$ -CN (Kunji y col., 1996), los péptidos liberados a partir de esta proteína podrían ser los responsables de la alta actividad determinada en la muestra LF-5 en comparación con la del resto de muestras de su grupo.

Un tercer grupo estaría formado por las muestras LF-4 y LF-13, que también presentaron valores de inhibición de la ACE inferiores al 50% y valores altos de nitrógeno peptídico, fundamentalmente la muestra LF-13, correspondiente a la cuajada, que contenía 224 mg/100g. Este valor notablemente elevado de péptidos con respecto al del resto de las muestras pudo deberse a la acción del cuajo durante el proceso de elaboración de este producto lácteo. El cuajo contiene distintas enzimas proteolíticas, de origen digestivo, como la quimosina y la pepsina y de origen microbiano (Dalglish, 1992), capaces de hidrolizar la  $\kappa$ -CN,  $\alpha_s$ -CN y  $\beta$ -CN, provocando esencialmente la desestabilización de las micelas y la coagulación de la leche, además de permitir la liberación de un gran número de péptidos. Sin embargo, la actividad inhibitoria de la ACE en estos péptidos fue poco destacada.

El análisis del perfil peptídico y proteico de los extractos solubles en agua de los productos lácteos fermentados se llevó a cabo mediante RP-HPLC, siguiendo el método descrito en el apartado 2.3.5. Mediante este análisis se quiso comprobar si el proceso tecnológico y más concretamente el tratamiento térmico aplicado a la leche de partida pudo influir sobre la actividad inhibitoria de la ACE observada en el producto lácteo fermentado. Además, el perfil peptídico nos daría información sobre la abundancia y la naturaleza de los péptidos formados. En todos los cromatogramas se observó el pico correspondiente a la  $\beta$ -Lg con un tiempo de retención de 60 minutos. La concentración de esta seroproteína se determinó en función del área del pico, teniendo en cuenta el área del patrón de  $\beta$ -Lg AB bovina empleado en el análisis. En la Figura 25 se muestran los resultados obtenidos de la

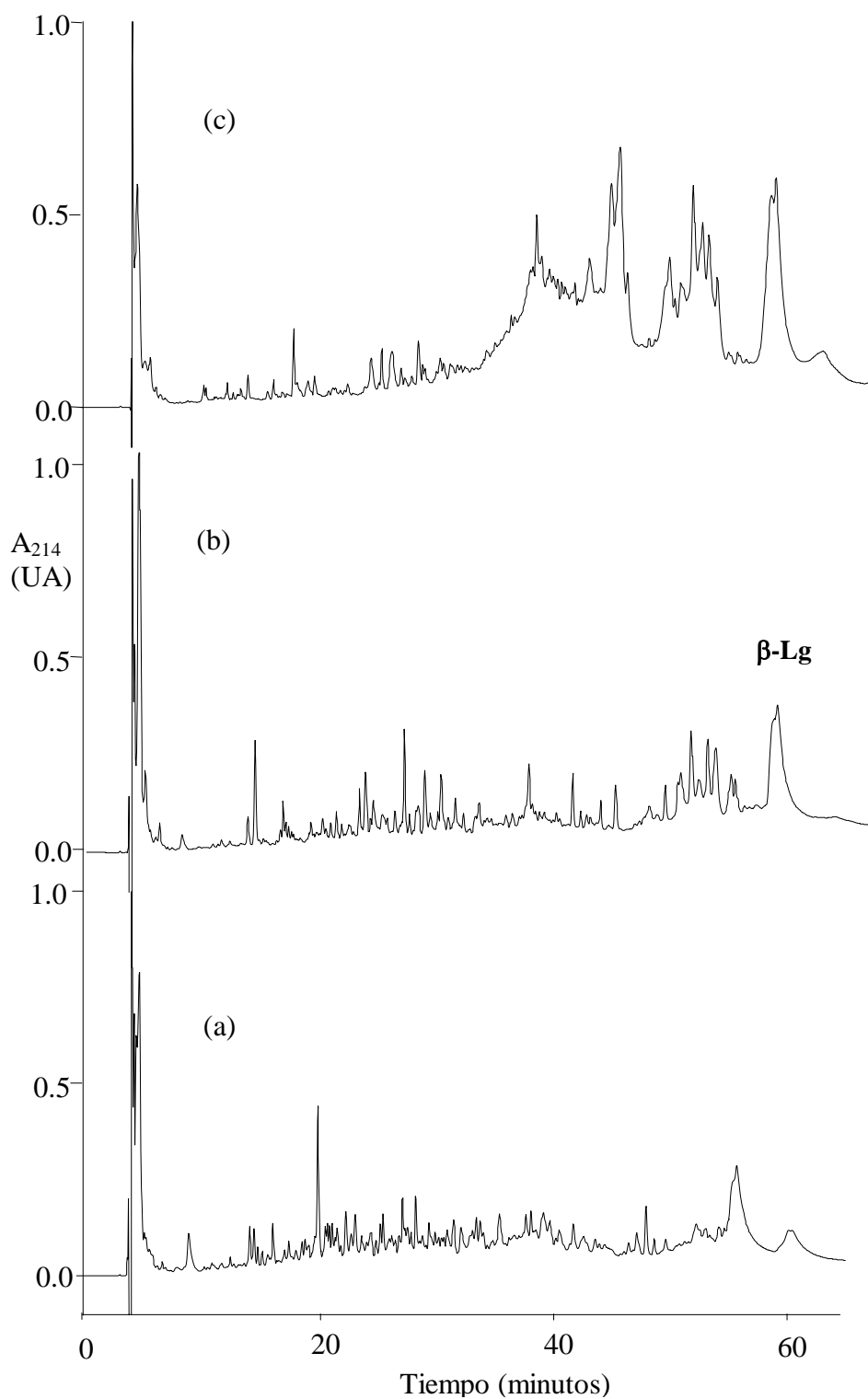


**Figura 25.** Concentración de  $\beta$ -Lg (mg/mL) en el extracto soluble en agua de los productos lácteos fermentados

concentración de  $\beta$ -Lg de los productos lácteos fermentados. En todas las muestras, el contenido de  $\beta$ -Lg fue inferior a 1,7 mg/mL, lo que indicó que la leche de partida había sido sometida a un tratamiento de pasterización elevado, como corresponde a la práctica habitual en la elaboración de estos productos (Buchheim y col., 1994). En la muestra LF-15, la concentración de  $\beta$ -Lg fue de 0,02 mg/mL, que puso de manifiesto un tratamiento térmico más elevado, de esterilización, tras el cual, prácticamente toda la  $\beta$ -Lg se había desnaturizado. Aunque no fue posible establecer una relación clara entre la desnaturización de la  $\beta$ -Lg y la mayor aparición de péptidos inhibidores de la ACE, sí se observó que las dos muestras con mayor actividad (LF-14 y LF-15) fueron aquellas cuyo contenido en  $\beta$ -Lg fue inferior. En el resto de las muestras, la concentración de  $\beta$ -Lg se encontró en el intervalo entre 0,12 y 1,67 mg/mL.

En los cromatogramas, los péptidos derivados de la hidrólisis de las caseínas por las enzimas de los microorganismos responsables del proceso de fermentación presentaron

tiempos de retención entre 5 y 60 minutos, variando la cantidad y el carácter hidrofóbico de los mismos en función de la muestra. Se ha descrito la influencia de la especificidad de las enzimas microbianas sobre la concentración y la diversidad de los péptidos liberados a partir de las caseínas durante el proceso de fermentación (Marshall y Tamime, 1997). Además, se ha descrito que el carácter hidrofóbico de los péptidos favorece de manera notable su actividad inhibitoria de la ACE (Cheung y col., 1980). A modo de ejemplo, en la Figura 26 se muestran los perfiles cromatográficos de tres muestras, LF-14 (kefir), LF-1 (yogur elaborado con leche de vaca) y LF-4 (yogur desnatado elaborado con leche de vaca), cada una de ellas perteneciente a uno de los tres grupos definidos anteriormente en función de la actividad inhibitoria de la ACE y del contenido peptídico. En el cromatograma de la muestra LF-14 (Figura 26.a) pudo observarse una gran cantidad de péptidos con una señal de absorbancia no muy elevada, lo que confirmó el valor intermedio de nitrógeno peptídico obtenido mediante el método de la ninhidrina-cadmio. En el cromatograma de la muestra LF-1 (Figura 26.b), la acción conjunta de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* condujo también a la liberación de una gran variedad de péptidos, todos ellos en una concentración intermedia. Sin embargo, en el cromatograma del yogur desnatado LF-4 (Figura 26.c), la señal de absorbancia de los picos fue mucho mayor, fundamentalmente la de aquellos que presentaron tiempos de retención entre 35 y 50 minutos. Estos péptidos de mayor hidrofobicidad probablemente también eran de mayor tamaño, lo que determinó la menor actividad inhibitoria de la ACE observada en este producto, a pesar del elevado valor del nitrógeno peptídico.



**Figura 26.** Cromatogramas de los extractos solubles en agua de los productos lácteos fermentados (a) LF-14, (b) LF-1 y (c) LF-4, obtenidos mediante RP-HPLC

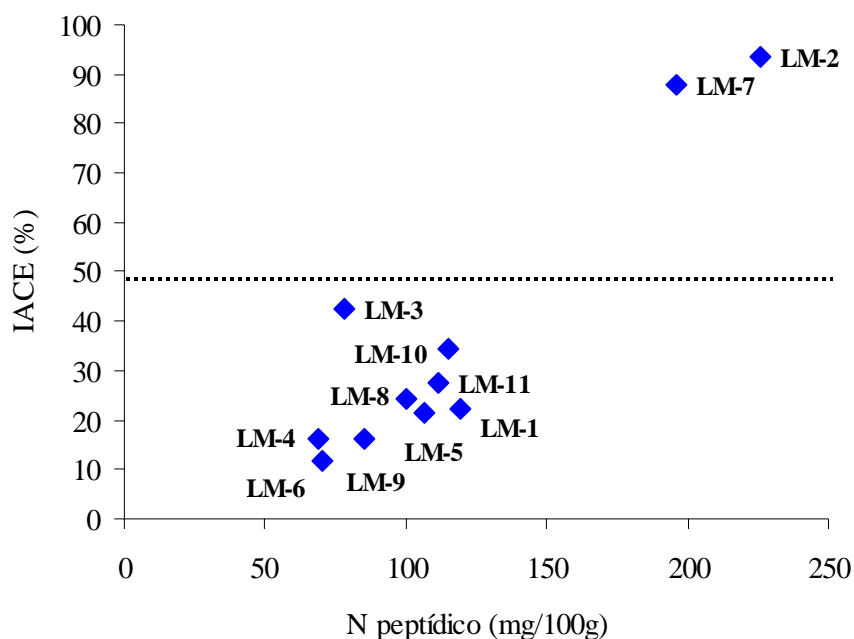
### 3.3.2. Actividad inhibitoria de la ACE en leches maternizadas

De manera similar a los productos lácteos fermentados, se obtuvo la fracción sérica a partir de las muestras de leches maternizadas. Para ello, el pH de estas muestras, situado en el intervalo entre 5,95 y 7,15, se ajustó a 4.6, según se indica en el apartado 3.3.2. En esta fracción sérica se determinó el contenido de nitrógeno total, amínico y peptídico y el porcentaje de inhibición de la ACE, cuyos resultados se muestran en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Actividad inhibitoria de la ACE (%), nitrógeno total, amínico y peptídico del extracto soluble en agua de las leches maternizadas (LM)

Muestra	IACE (%)	N <sub>total</sub> (mg/100g)	N <sub>amínico</sub> (mg/100g)	N <sub>peptídico</sub> (mg/100g)
LM-1	22,4 ± 5,1	120 ± 1,4	0,4 ± 0,01	119,6
LM-2	93,4 ± 1,0	316 ± 1,4	90,0 ± 3,2	226,0
LM-3	42,6 ± 6,3	82,5 ± 0,7	4,0 ± 0,01	78,0
LM-4	16,1 ± 0,1	70,5 ± 0,7	1,0 ± 0	69,0
LM-5	21,3 ± 2,3	111 ± 4,2	4,5 ± 0,24	106,5
LM-6	11,8 ± 6,1	71,5 ± 3,5	0,5 ± 0,02	70,5
LM-7	88,0 ± 5,3	205 ± 4,2	8,7 ± 0,53	196,3
LM-8	24,4 ± 0,5	102,5 ± 0,7	1,6 ± 0,06	100,4
LM-9	16,4 ± 4,1	86 ± 1,4	0,9 ± 0,01	85,1
LM-10	34,4 ± 7,0	117 ± 1,4	1,9 ± 0,03	115,1
LM-11	27,7 ± 2,3	112 ± 0	0,8 ± 0,04	111,2

Al igual que en los productos lácteos fermentados, en estas muestras se observaron importantes diferencias, en función de la composición y las características de la muestra. La relación entre el porcentaje de inhibición de la ACE y el nitrógeno peptídico se muestra en la Figura 27. Teniendo en cuenta esta relación, se distinguieron claramente dos grupos



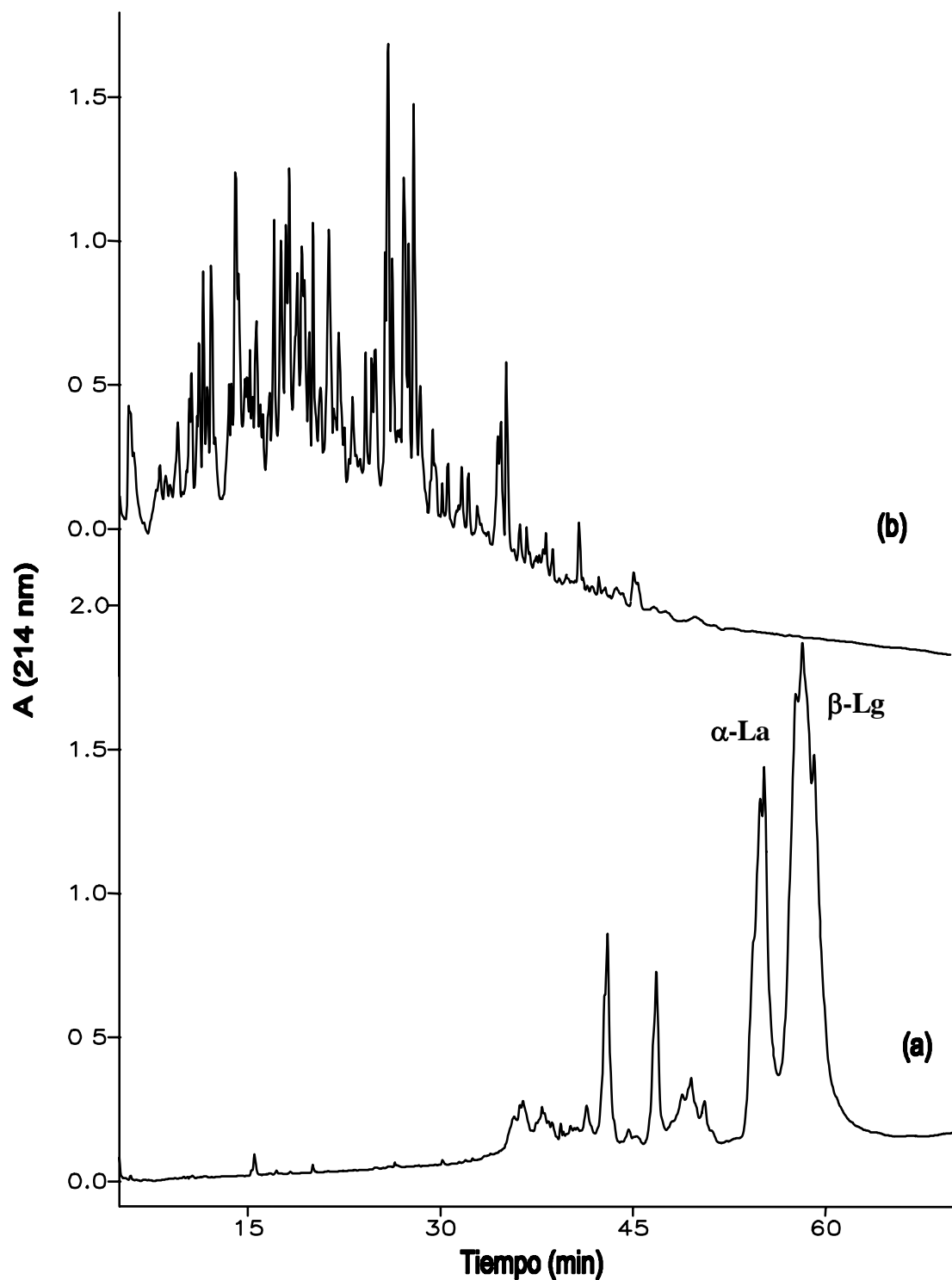
**Figura 27.** Relación entre la actividad inhibitoria de la ACE (%) y el contenido de nitrógeno peptídico (mg/100 g) del extracto soluble en agua de las leches maternizadas

de leches maternizadas. Uno de ellos agrupó a las muestras LM-2 y LM-7, que presentaron porcentajes de inhibición de la ACE superiores al 85% y valores de nitrógeno peptídico relativamente altos, entre 195 y 226 mg/100g. Según la etiqueta, estas fórmulas infantiles correspondían a hidrolizados de caseínas y proteínas de suero, respectivamente. La hidrólisis que tuvo lugar durante el procesado de estas leches maternizadas permitió la liberación de péptidos inhibidores de la ACE. La formación de péptidos por el proceso de hidrólisis enzimática se confirmó al determinar el contenido de nitrógeno peptídico de estas muestras, cuyo valor fue superior a 195 mg/100g y mediante el análisis mediante RP-HPLC.

El otro grupo estaba constituido por el resto de muestras de leches maternizadas, que presentaron porcentajes de inhibición de la ACE inferiores al 50% y cuyo contenido de nitrógeno peptídico se encontró en el intervalo entre 69 y 120 mg/100g. Estas fórmulas infantiles estaban elaboradas con suero lácteo o leche desnatada. Dentro de este grupo, la muestra LM-3 presentó un porcentaje de inhibición ligeramente superior al del resto de las

muestras. Según la etiqueta, este producto estaba elaborado con suero lácteo desmineralizado y proteínas de leche. El análisis de la fracción soluble a pH 4,6 mediante RP-HPLC confirmó la composición de este producto, identificándose los componentes mayoritarios de esta fracción como  $\beta$ -Lg,  $\alpha$ -La, y CMP. Por el contrario, dentro de este grupo, las muestras LM-4, LM-6 y LM-9 presentaron porcentajes de inhibición de la ACE bajos, inferiores al 20%. Estas muestras, junto con otras de este grupo estaban elaboradas con suero y/o leche desnatada por lo que estas muestras carecían de péptidos responsables de actividad. Según la etiqueta, el producto LM-6 había sido elaborado utilizando fermentos lácticos pero el porcentaje de inhibición de la ACE fue del 12%, lo que reveló que los cultivos empleados en esta fórmula infantil, denominada probiótica, no pudieron hidrolizar las proteínas de la leche desnatada y por lo tanto no se liberaron péptidos inhibidores de la ACE. El perfil cromatográfico de esta muestra también puso de manifiesto la ausencia de péptidos en la fracción soluble, habiéndose identificado principalmente proteínas séricas, CMP y algunos fragmentos peptídicos de elevada hidrofobicidad y probablemente de gran tamaño e inactivos.

A modo de ejemplo, en la Figura 28 se muestran los perfiles cromatográficos de dos de las muestras analizadas, LM-1 y LM-7, cada una de ellas perteneciente a los dos grupos descritos anteriormente. En el cromatograma de la muestra LM-1 (Figura 28.a), elaborada con concentrados de proteínas séricas, los picos correspondientes a las proteínas del suero presentaron altos valores de absorbancia, fundamentalmente los picos de la  $\beta$ -Lg y de la  $\alpha$ -La, con tiempos de retención de 60 y 55 minutos, respectivamente. El pico de la BSA, de tiempo de retención de 50 minutos presentó una señal de intensidad menor y se identificaron los picos correspondientes a las dos variantes genéticas del CMP. Sin embargo, la señal de los picos situados en el intervalo de tiempo de retención entre 0 y 40 minutos correspondientes a péptidos fue muy baja, prácticamente imperceptible. En el resto de las muestras de este grupo los perfiles cromatográficos fueron muy similares al obtenido para la muestra LM-1, diferenciándose principalmente en la concentración y la proporción de cada una de las proteínas presentes en la fracción sérica. Por el contrario, el alto contenido de péptidos determinado en la muestra LM-7, constituida por proteínas de suero hidrolizadas, se confirmó mediante el análisis cromatográfico (Figura 28.b). Se observó gran número de picos, cuyos tiempos de retención se encontraron en el intervalo entre 0 y 40 minutos. La muestra LM-2, que correspondía a un hidrolizado de caseínas,

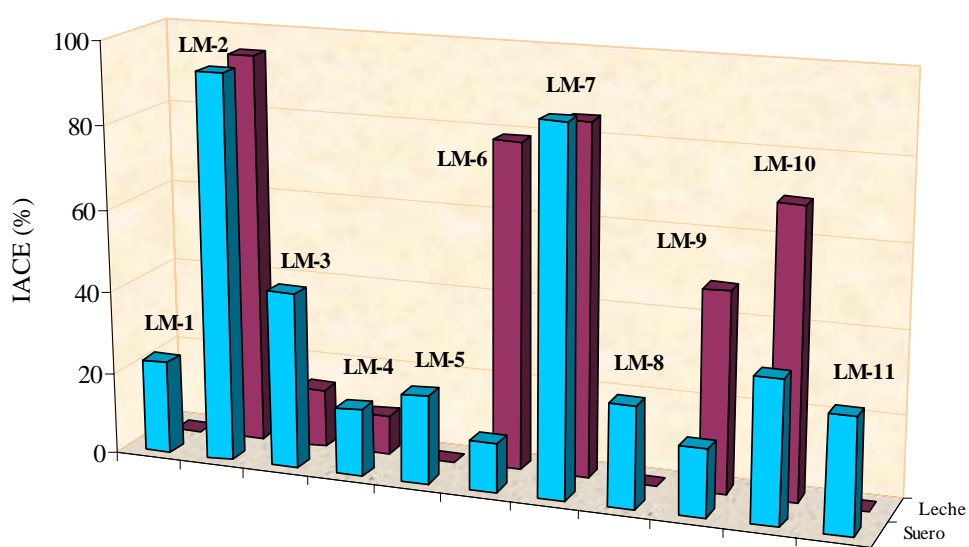


**Figura 28.** Cromatogramas de los extractos solubles en agua de las leches maternizadas (a) LM-1 y (b) LM-7, obtenidos mediante RP-HPLC



también presentó un perfil similar con un gran número de péptidos con tiempos de retención en el intervalo entre 0 y 30 min.

Con el objetivo de comprobar si todos los péptidos responsables de la actividad inhibitoria de la ACE se habían solubilizado a pH 4,6, se determinó esta actividad en las soluciones acuosas de las muestras de leches maternizadas. En la Figura 29 se comparan los valores del porcentaje de inhibición de la ACE en las muestras de leches maternizadas y en los extractos solubles en agua obtenidos a partir de las dichas muestras.



**Figura 29.** Porcentajes de inhibición de la ACE de las leches maternizadas y de las fracciones séricas obtenidas a partir de ellas

En algunas muestras (LM-2, LM-7), la actividad de la solución acuosa de la leche y de la fracción sérica obtenida a partir de ella fue similar, lo que indicó que probablemente los péptidos responsables de la actividad se solubilizaron a pH 4,6. En otros casos (LM-6, LM-9 y LM-10), la actividad inhibitoria de la ACE fue superior en la solución acuosa de la leche que en la fracción soluble a pH 4,6. Este comportamiento pudo ser debido a la presencia de péptidos bioactivos no solubles a pH 4,6 que precipitaron junto a las caseínas, no formando parte de la fracción sérica. Sin embargo, en la mayor parte de las muestras (LM-1, LM-3, LM-5, LM-8 y LM-11), la actividad inhibitoria de la ACE del extracto

soluble en agua fue superior al de la solución de leche de partida. Esta mayor actividad pudo ser debida a una disminución de volumen y el consecuente incremento de la concentración de los péptidos bioactivos en la fracción sérica. Otra de las posibles razones de este comportamiento pudo ser la interacción de algunos componentes de la leche maternizada de origen, que, durante el método de determinación de la actividad inhibitoria de la ACE, fueron extraídos con el acetato de etilo y que pudieron afectar a la medida espectrofotométrica, dando lugar a un valor de porcentaje de inhibición inferior al real (efecto matriz).

Para las muestras LM-1 y LM-7, en las que los porcentajes de inhibición fueron superiores al 85%, se determinó el valor del  $IC_{50}$  en la solución acuosa de las mismas que fue de 81,4 y 101,3  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

### 3.3.3. Actividad inhibitoria de la ACE en quesos frescos y mousses de quesos frescos

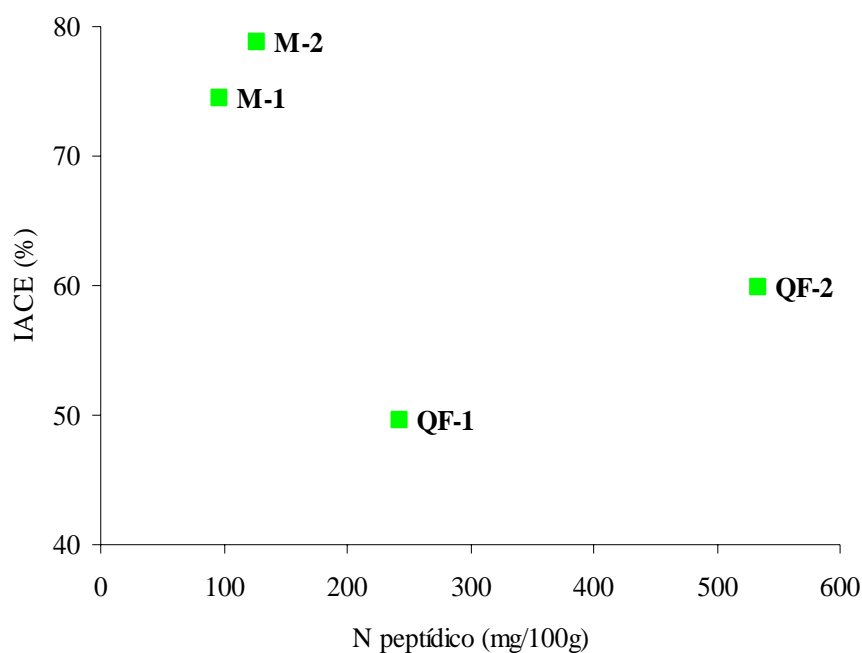
De manera similar a los productos lácteos anteriores, la fracción sérica de las muestras de quesos frescos y de mousses de quesos frescos se preparó siguiendo el método detallado en el apartado 2.3.2. En esta fracción se determinó el contenido de nitrógeno total, amínico y peptídico, así como la actividad inhibitoria de la ACE, cuyos resultados se muestran en la Tabla 21.

**Tabla 21.** Actividad inhibitoria de la ACE (%), nitrógeno total, amínico y peptídico del extracto soluble en agua de los quesos frescos (QF) y de las mousses de quesos frescos (M)

Muestra	IACE (%)	N <sub>total</sub> (mg/100g)	N <sub>amínico</sub> (mg/100g)	N <sub>peptídico</sub> (mg/100g)
QF-1	49,7 ± 1,3	244,5 ± 0,7	1,8 ± 0,04	242,2
QF-2	59,8 ± 3,3	536,5 ± 5	2,2 ± 0,04	533,8
M-1	74,4 ± 4,2	98 ± 1,4	1,1 ± 0,08	97,0
M-2	78,8 ± 2,9	128,5 ± 0,7	1,5 ± 0,11	126,5

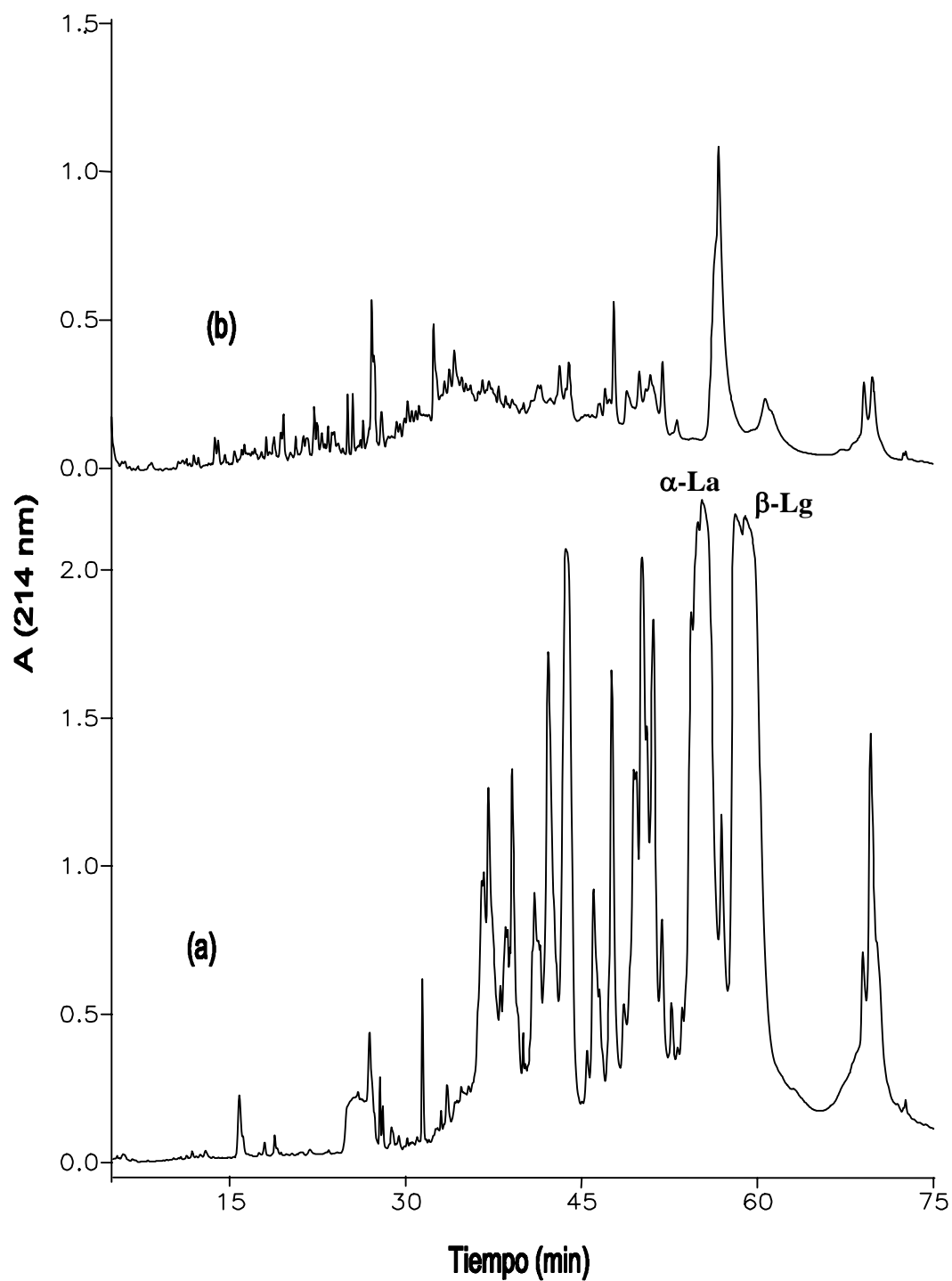
Los porcentajes de actividad en las muestras de los quesos frescos QF-1 y QF-2 fueron del 50 y del 60%, respectivamente. Estos resultados fueron superiores al 12% descrito por Meisel y col., (1997) para un queso fresco. Incluso, otros autores han referido la necesidad del proceso de maduración en la formación de péptidos inhibidores de la ACE, describiendo la ausencia de estos péptidos en quesos no maduros, como el Cottage (Okamoto y col., 1995). La discrepancia entre los resultados pudo deberse al tipo de cuajo o de cultivo iniciador empleados durante la elaboración de los quesos frescos, que en nuestras muestras permitieron la liberación de péptidos bioactivos y solubles a pH 4,6. El mayor porcentaje de inhibición de la ACE, así como el mayor contenido de nitrógeno peptídico determinados en el queso fresco QF-2, pudo deberse a la acción de los fermentos lácticos adicionados a este producto (*Lb. reuteri*, según etiquetado) conjuntamente con la acción del cuajo.

Al relacionar el porcentaje de inhibición de la ACE y el contenido de nitrógeno peptídico (Figura 30) pudo advertirse un comportamiento muy similar entre las dos muestras de mousses de quesos frescos. Ambas muestras M-1 y M-2 presentaron un porcentaje de inhibición del 74 y del 79% y un contenido de nitrógeno peptídico de 97 y 127 mg/100g, respectivamente. Probablemente, la acción del cuajo, junto a la de los fermentos lácticos empleados en la elaboración de este tipo de productos lácteos permitió la liberación, a partir de las caseínas de péptidos de elevada actividad inhibitoria de la ACE.



**Figura 30.** Relación entre la actividad inhibitoria de la ACE (%) y el contenido de nitrógeno peptídico (mg/100 g) del extracto soluble en agua de los quesos frescos y de las mousses de quesos frescos

A modo de ejemplo, en la Figura 31 se muestran los cromatogramas obtenidos mediante RP-HPLC para la muestra de queso fresco QF-2 y para la mousse de queso fresco M-1, observándose claramente las diferencias entre ambas muestras. En el cromatograma correspondiente a la muestra de queso fresco se identificaron los picos de las proteínas mayoritarias del suero,  $\beta$ -Lg y  $\alpha$ -La, con tiempos de retención de 60 y 55 minutos, respectivamente y con una señal de absorbancia elevada. Además, la alta intensidad de otros picos, que presentaron tiempos de retención en el intervalo entre 30 y 50 minutos confirmaron el alto valor del contenido de nitrógeno peptídico determinado en los análisis anteriores (Tabla 21). De manera similar, el menor contenido de péptidos presentes en el extracto soluble en agua de la mousse de queso fresco se puso de manifiesto en el análisis cromatográfico de dicho extracto, en el cual se observaron gran variedad de picos, con tiempos de retención en el rango entre 10 y 50 minutos, pero cuya señal de absorbancia fue poco intensa. Igualmente, las proteínas del suero se encontraban en menor concentración, fundamentalmente la  $\beta$ -Lg, cuyo pico era prácticamente imperceptible en el



**Figura 31.** Cromatogramas de los extractos solubles en agua del (a) queso fresco QF-2 y (b) mousse de queso fresco M-1, obtenidos mediante RP-HPLC

cromatograma, lo que indicó probablemente la aplicación de un tratamiento térmico intenso de la leche de partida.

### **3.3.4. Simulación de la digestión gastrointestinal de productos lácteos fermentados y de leches maternizadas**

En esta parte del trabajo se ha llevado a cabo el estudio de las variaciones de la actividad inhibitoria de la ACE en dos productos lácteos fermentados y en dos leches maternizadas, tras la simulación de las condiciones de hidrólisis en el tracto gastrointestinal.

Previamente, y con el objetivo de confirmar la eficacia de las condiciones enzimáticas seleccionadas (apartado 2.3.6.), se estudió el efecto de dichas condiciones sobre la  $\beta$ -Lg AB bovina y sobre el CMP. La simulación de la digestión sobre la  $\beta$ -Lg se empleó como control positivo del proceso, ya que se sabe que esta proteína de suero es sensible a la acción de las proteasas gastrointestinales, como la tripsina y la quimotripsina (Schmidt y Poll, 1991; Otte y col., 1997). Sin embargo, Chabance y col., (1998) habían detectado la presencia de CMP en el plasma de humanos adultos tras la ingestión de leche o yogur, lo que pone de manifiesto la resistencia de este macropéptido al paso por el tracto gastrointestinal, así como la absorción a través de la barrera intestinal. Por lo tanto, se pretendía emplear la simulación de las condiciones de hidrólisis sobre el CMP como control negativo de dicha simulación. El proceso de hidrólisis se siguió mediante RP-HPLC, siguiendo el método descrito en el apartado 2.3.5.

La  $\beta$ -Lg bovina resistió la acción de la pepsina, de modo que tras la incubación durante 90 minutos con esta enzima, un 53% de la  $\beta$ -Lg permaneció inalterada. La resistencia de la  $\beta$ -Lg bovina a la pepsina había sido descrita por distintos autores, bajo diferentes condiciones de hidrólisis (Schmidt y Poll, 1991; Otte y col., 1997). Esta resistencia a la pepsina se debe, tanto a la presencia de dos enlaces disulfuro intramoleculares que incrementan la estabilidad de la  $\beta$ -Lg (Reddy y col., 1988), como a la presencia de enlaces peptídicos teóricamente susceptibles a la acción de la pepsina, pero ocultos en la estructura nativa de la proteína y por lo tanto inaccesibles a dicha enzima (Dalgalarondo y col., 1993). Sin embargo, la acción de la Corolasa PP durante 30 minutos

provocó la hidrólisis del 90% de la  $\beta$ -Lg que había permanecido intacta tras la incubación con pepsina y esta proteína desapareció totalmente tras los 90 minutos adicionales de hidrólisis por la Corolasa PP. Esta actividad de la Corolasa PP sobre la  $\beta$ -Lg era esperable ya que la tripsina y la quimotripsina son capaces de hidrolizar la  $\beta$ -Lg (apartado 3.1.2.). Estos resultados preliminares determinaron la eficacia de las condiciones enzimáticas seleccionadas.

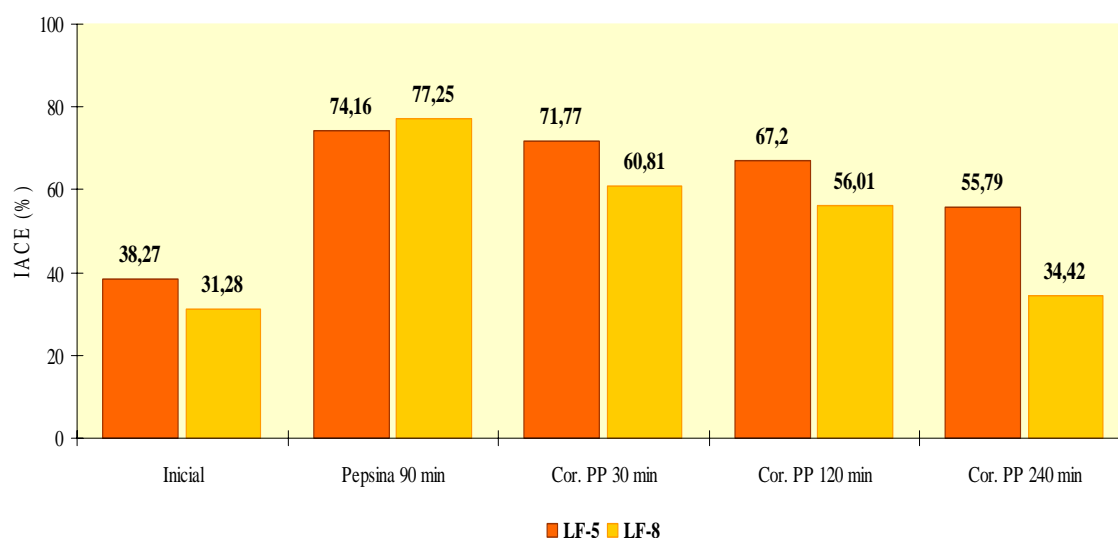
Tras la acción de la pepsina durante 90 minutos, el CMP ya se había hidrolizado totalmente. La susceptibilidad del CMP a la pepsina a pH ácido había sido descrita por Shammet y col., (1992). Estos mismos autores habían referido que esta sensibilidad del CMP, no mostrada al pH normal de la leche, se debía al cambio en la distribución de las cargas y a la reducción en la repulsión electrostática, que mejoraban la unión del CMP a la pepsina. El proceso de hidrólisis de los fragmentos liberados tras la acción de la pepsina prosiguió con la incubación durante 2 horas con la Corolasa PP. Las tres Lys sensibles a la tripsina y los aminoácidos susceptibles a la quimotripsina, presentes en la secuencia del CMP (Shammet y col. 1992), permitieron su posterior hidrólisis. En el cromatograma correspondiente a las 2 horas de hidrólisis con Corolasa PP, se puso de manifiesto el incremento de la señal de absorbancia de los péptidos de mayor hidrofilia, con tiempos de retención entre 0 y 30 minutos. Por lo tanto, las condiciones seleccionadas provocaron la hidrólisis del CMP, por lo que la presencia de este péptido en el plasma descrita por Chabance y col., (1998) pudo deberse, bien a las interacciones con otros componentes de la dieta que impidieron su degradación o bien a su absorción, antes de sufrir el ataque enzimático.

A pesar de que los resultados tras la digestión del CMP no fueron los esperados, las condiciones enzimáticas habían sido empleadas de manera satisfactoria por Alting y col., (1997) para simular la digestión gastrointestinal de la BSA, por lo que optamos por emplear dicho método para la simulación de la digestión de los productos lácteos fermentados y de las leches maternizadas.

### 3.3.4.1. Simulación de la digestión gastrointestinal de productos lácteos fermentados

De los quince productos lácteos fermentados analizados en el apartado 2.3.1., se seleccionaron dos de ellos, LF-5 y LF-8, para comprobar si el proceso de digestión influía en su actividad inhibitoria de la ACE. Estos dos productos pertenecían, por su relación entre el porcentaje de inhibición y el contenido de nitrógeno peptídico, al segundo grupo de productos lácteos fermentados descrito en dicho apartado. Sin embargo, ambas muestras presentaron comportamientos diferentes, y así, la muestra LM-5 presentó un bajo contenido en péptidos, pero que poseían una elevada actividad. Sin embargo, la muestra LM-8 presentó una actividad inhibitoria de la ACE muy baja a pesar de la mayor concentración peptídica. La consistencia líquida fue otro de los factores determinantes en la elección de estos dos productos, ya que favorecería el proceso de dispersión en el medio de digestión.

La simulación de la digestión se llevó a cabo siguiendo el método descrito en el apartado 2.3.6. Se determinó la actividad inhibitoria de la ACE en la solución acuosa de los productos lácteos fermentados y en los hidrolizados obtenidos tras la acción de la pepsina durante 90 minutos y de la Corolasa PP durante 30 minutos, 2 y 4 horas (Figura 32).



**Figura 32.** Evolución de la actividad inhibitoria de la ACE con la hidrólisis digestiva de los productos lácteos fermentados LF-5 y LF-8



Los porcentajes de inhibición de la ACE de las dos muestras LF-5 y LF-8 sin hidrolizar fueron similares, del 38% y 31%, respectivamente. Tras la hidrólisis con la pepsina durante 90 minutos, se observó un notable incremento de la actividad, alcanzándose valores superiores al 74% en ambas muestras. La incubación con pepsina llevada a cabo tras la fermentación de una muestra de leche UHT con *Lactobacillus* GG había sido empleada de manera satisfactoria en el aislamiento de secuencias peptídicas con actividad inhibitoria de la ACE (Rokka y col., 1997). Además, en estudios *in vivo* se ha descrito la liberación de péptidos bioactivos durante los primeros 30 minutos de hidrólisis digestiva con pepsina (Daniel y col., 1993). Los péptidos responsables de la actividad inhibitoria de la ACE determinada en los hidrolizados pépticos pudieron originarse tras la acción de dicha enzima sobre las caseínas, la  $\alpha$ -La o sobre los péptidos inicialmente formados durante el proceso de fermentación de la leche. La susceptibilidad de las caseínas a la pepsina había sido descrita por Sakai y col., (2000), que observaron la desaparición de las bandas electroforéticas correspondientes a todas las caseínas tras la incubación de estas proteínas con pepsina durante 30 minutos. De manera similar, la  $\alpha$ -La se ha descrito como una proteína susceptible a la acción de esta enzima gástrica, aunque el proceso de hidrólisis se produce de manera más gradual (Schmidt y van Marwijk, 1993). Por el contrario, la  $\beta$ -Lg es resistente a la acción de la pepsina, observándose un alto porcentaje del pico de esta proteína en el cromatograma correspondiente al hidrolizado tras 90 minutos de incubación con la enzima gástrica.

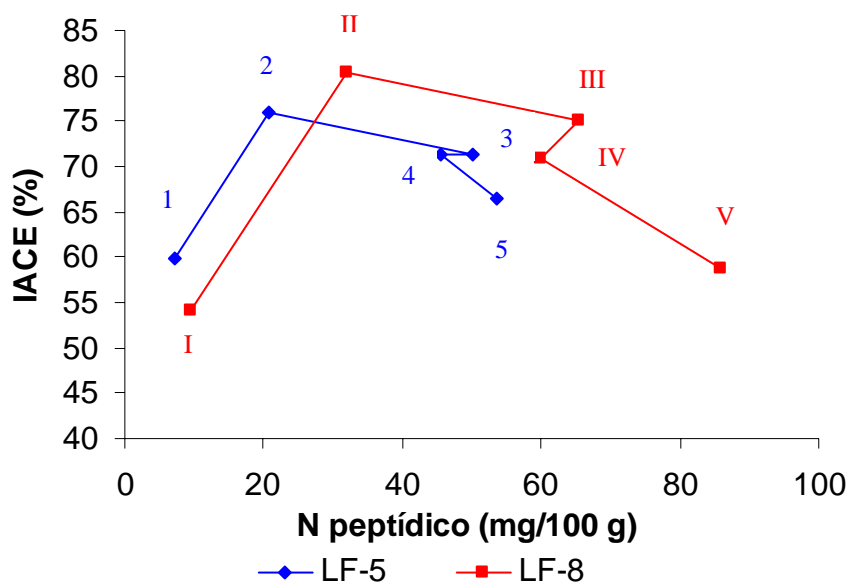
Los hidrolizados de los productos lácteos fermentados obtenidos tras la acción de la Corolasa PP presentaron porcentajes de inhibición inferiores a los obtenidos en los hidrolizados con pepsina. Este descenso tuvo lugar de manera gradual para la leche fermentada LF-5, alcanzando el 56% a las 4 horas de incubación, valor superior al del producto lácteo previo a la hidrólisis. Para la muestra LF-8, el descenso fue más acusado, por lo que el porcentaje de inhibición de la ACE a las 4 horas de acción de la Corolasa PP fue del 34%, similar al del producto inicial. Como conclusión se puede destacar que tras la simulación gastrointestinal de estos dos productos lácteos fermentados, el porcentaje de inhibición de la ACE aumenta (LF-5) o se mantiene a niveles similares a los encontrados en el producto intacto (LF-8).

Lógicamente, era de esperar que los péptidos responsables de la actividad inhibitoria de la ACE fueran distintos y de menor tamaño en el producto hidrolizado que en el producto intacto. Distintos autores han descrito como responsables de la actividad inhibitoria de la ACE las fracciones peptídicas de pequeño tamaño liberadas durante la hidrólisis de las proteínas lácteas (Mullally y col., 1997b; Pihlanto-Leppälä y col., 2000). Con el objetivo de confirmar estos resultados, se obtuvo mediante ultrafiltración la fracción inferior a 3000 Da a partir de dichos hidrolizados. Para ello, se siguió el método descrito en el apartado 2.3.6. En esta fracción se determinó el contenido de nitrógeno total, amínico y peptídico, así como la actividad inhibitoria de la ACE, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 22.

**Tabla 22.** *Actividad inhibitoria de la ACE (%), nitrógeno total, amínico y peptídico (mg/100g) de la fracción inferior a 3000 Da de los hidrolizados digestivos de los productos lácteos fermentados LF-5 y LF-8*

Muestra	Enzima	Tiempo (min)	Nº muestra	IACE (%)	N <sub>total</sub> (mg/100g)	N <sub>amínico</sub> (mg/100g)	N <sub>peptídico</sub> (mg/100g)
LF-5	Inicial	0	1	59,9 ± 1,0	7,8 ± 0,4	0,5 ± 0,1	7,3
	Pepsina	90	2	76,0 ± 4,4	22,0 ± 0	1,3 ± 0,2	20,7
	Corolasa PP	30	3	71,3 ± 5,5	56,5 ± 0,7	6,3 ± 0,4	50,2
	Corolasa PP	120	4	71,4 ± 3,9	52,5 ± 3,5	7,0 ± 0,4	45,5
	Corolasa PP	240	5	66,4 ± 1,7	63,0 ± 0	9,3 ± 0,1	53,7
LF-8	Inicial	0	I	54,2 ± 4,4	9,8 ± 0,4	0,3 ± 0	9,5
	Pepsina	90	II	80,4 ± 1,2	33,0 ± 1,4	0,9 ± 0,1	32,1
	Corolasa PP	30	III	75,0 ± 4,5	72,5 ± 0,7	7,1 ± 0	65,4
	Corolasa PP	120	IV	70,8 ± 1,2	67,0 ± 1,4	7,1 ± 0,03	59,9
	Corolasa PP	240	V	58,8 ± 5,1	95,5 ± 3,5	9,6 ± 0	85,9

Además la evolución de la actividad inhibitoria de la ACE frente al contenido en nitrógeno peptídico de estos hidrolizados se muestra en la Figura 33.



**Figura 33.** Evolución, durante el proceso de digestión gastrointestinal, de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al nitrógeno peptídico en la fracción menor de 3000 Da obtenida a partir de los productos lácteos fermentados LF-5 y LF-8. La muestra correspondiente al número de la figura se detalla en la Tabla 22.

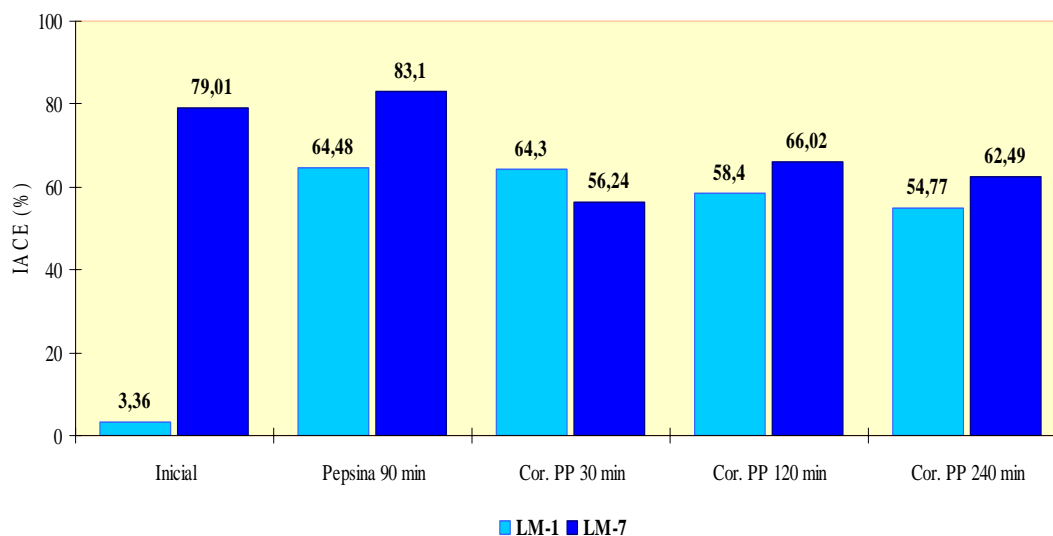
Para ambos productos lácteos fermentados se observó un comportamiento semejante durante el proceso de digestión gastrointestinal. En la fracción menor de 3000 Da de los productos sin digerir, la actividad inhibitoria de la ACE fue similar, con valores del 60 y del 54%, para los productos LF-5 y LF-8, respectivamente. De manera análoga, el contenido de peptídico en ambas fracciones fue muy parecido, de 7,3 y 9,5 mg/100 g, respectivamente. Se observó un notable aumento de la actividad inhibitoria de la ACE en dicha fracción, alcanzando valores superiores al 75% tras la digestión con pepsina, lo que indicó la potente contribución a la actividad inhibitoria de la ACE de los péptidos de pequeño tamaño (<3000 Da).

El comportamiento de esta fracción de pequeño tamaño tras la acción de la Corolasa PP, también fue similar a lo observado en el hidrolizado total. Se observó un descenso del porcentaje de inhibición de la ACE y un destacado incremento del contenido de péptidos de pequeño tamaño con el avance de la simulación gastrointestinal. El descenso de la actividad fue mucho más acusado para el producto LF-8, cuyo contenido de nitrógeno peptídico aumentó también de manera más señalada. La digestión de los dos productos lácteos fermentados condujo, por tanto, a la liberación de péptidos de pequeño tamaño, presentes en la fracción menor a 3000 Da, cuya actividad inhibitoria de la ACE fue ligeramente superior a la determinada en la fracción del producto previo a la digestión. Estos péptidos de menor tamaño y que se originan por la acción de las enzimas gastrointestinales podrían ser absorbidos a través del tracto gastrointestinal para ejercer su actividad antihipertensiva *in vivo*. Para confirmar este aspecto sería necesario realizar estudios con animales de experimentación.

#### **3.3.4.2. Simulación de la digestión gastrointestinal de leches maternizadas**

De manera análoga a los productos lácteos fermentados y con el propósito de estudiar las variaciones en la actividad inhibitoria de la ACE, se seleccionaron dos de las once leches maternizadas analizadas en el apartado 2.3.2. (LF-1 y LF-7), para llevar a cabo la simulación de las condiciones del tracto gastrointestinal de los neonatos. El distinto comportamiento de estas muestras en cuanto al perfil cromatográfico y la actividad inhibitoria de la ACE, debido a su diferente composición fue el factor condicionante en la elección de dichas muestras.

La simulación de la digestión se realizó de manera similar a la de los productos lácteos fermentados, ajustando el pH de acción de la pepsina hasta 3,5, asemejando el mayor pH existente en el estómago de los recién nacidos (Mason, 1962). Se determinó el porcentaje de inhibición de la ACE en la solución acuosa de las dos leches maternizadas, previa a la hidrólisis y en los hidrolizados obtenidos tras la acción de la pepsina durante 90 minutos y de la Corolasa PP durante 30 minutos, 2 y 4 horas. Los resultados se muestran en la Figura 34.



**Figura 34.** Evolución de la actividad inhibitoria de la ACE con la hidrólisis digestiva de las leches maternizadas LM-1 y LM-7

Como ya se había comprobado, la muestra LM-1 no presentó actividad inhibitoria de la ACE, a diferencia de la muestra LM-7, cuyo porcentaje de inhibición fue del 79%. Tras la incubación con pepsina durante 90 minutos, se observó un importante incremento de la actividad en la muestra LM-1, hasta el 64,5%. Se ha comprobado que al pH empleado en la digestión, la pepsina actúa de manera óptima sobre todas las caseínas (Mason, 1962), lo que permitiría la liberación de péptidos inhibidores de la ACE. Además, la pepsina podría actuar sobre la  $\alpha$ -La y sobre el CMP, cuya presencia se había comprobado mediante el análisis cromatográfico de la fracción sérica (Figura 28), suponiendo estas proteínas una fuente adicional de péptidos inhibidores de la ACE.

Tras la incubación con la Corolasa PP, el porcentaje de inhibición de la ACE se mantuvo constante con respecto al del hidrolizado por pepsina, con valores en el intervalo entre el 55 y el 60%, lo que supuso unos valores notablemente mayores al determinado en el producto sin digerir. Por lo tanto, pudo confirmarse la eficacia del proceso de digestión gastrointestinal de esta fórmula infantil para la liberación de secuencias peptídicas inhibitoras de la ACE.

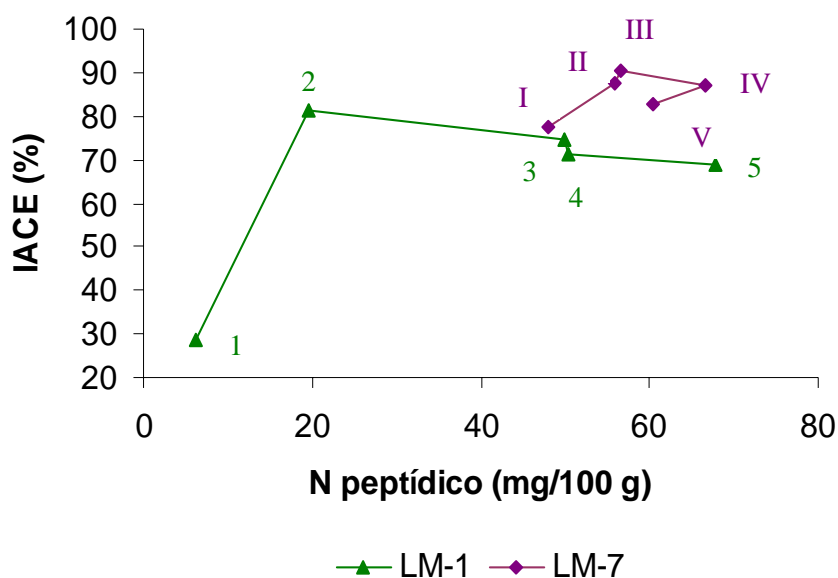
Por otra parte, la acción de las enzima gastrointestinales sobre la muestra LM-7 no supuso una modificación destacada en el porcentaje de inhibición con respecto al del producto sin digerir. Esto pudo deberse a la resistencia de los fragmentos responsables de la actividad a la acción de estas enzimas.

De manera análoga a los productos lácteos fermentados y para confirmar que la actividad inhibitoria de la ACE era debida fundamentalmente a péptidos de pequeño tamaño, se obtuvo mediante ultrafiltración la fracción inferior a 3000 Da a partir de las dos muestras de leches maternizadas y de sus hidrolizados digestivos, siguiendo el método detallado en el apartado 2.3.6. Los resultados obtenidos del contenido de nitrógeno total, amínico y peptídico y de la actividad inhibitoria de la ACE de la fracción menor de 3000 Da se muestran en la Tabla 23.

**Tabla 23.** *Actividad inhibitoria de la ACE (%), nitrógeno total, amínico y peptídico (mg/100g) de la fracción inferior a 3000 Da de los hidrolizados digestivos de las leches maternizadas LM-1 y LM-7*

Muestra	Enzima	Tiempo (min)	Nº muestra	IACE (%)	N <sub>total</sub> (mg/100g)	N <sub>amínico</sub> (mg/100g)	N <sub>peptídico</sub> (mg/100g)
LM-1	Inicial	0	1	28,8 ± 6,1	6,2 ± 0,4	0,01 ± 0	6,2
	Pepsina	90	2	81,5 ± 2,2	20,0 ± 0	0,3 ± 0,01	19,7
	Corolasa PP	30	3	74,5 ± 0	58,5 ± 0,7	8,5 ± 1,0	50,0
	Corolasa PP	120	4	71,2 ± 5,0	61,5 ± 2,1	11,1 ± 0,7	50,4
	Corolasa PP	240	5	69,1 ± 2,1	80,0 ± 1,4	12,2 ± 0	67,8
LM-7	Inicial	0	I	77,4 ± 1,2	52,4 ± 0,1	4,3 ± 0,6	48,1
	Pepsina	90	II	87,7 ± 0,2	61,0 ± 1,4	5,1 ± 0,2	55,9
	Corolasa PP	30	III	90,3 ± 0,4	65,0 ± 0	8,3 ± 0,3	56,7
	Corolasa PP	120	IV	86,9 ± 3,3	78,0 ± 1,4	11,3 ± 0,6	66,7
	Corolasa PP	240	V	82,6 ± 1,3	72,5 ± 0,7	12,0 ± 0,01	60,5

Además, la evolución de la actividad inhibitoria de la ACE frente al contenido en nitrógeno peptídico de estos hidrolizados se muestra en la Figura 35.



**Figura 35.** Evolución, durante el proceso de digestión gastrointestinal, de la actividad inhibitoria de la ACE con respecto al nitrógeno peptídico en la fracción menor de 3000 Da obtenida a partir de las leches maternizadas LM-1 y LM-7. La muestra correspondiente al número de la figura se detalla en la Tabla 23.

Teniendo en cuenta la evolución durante la digestión de la relación entre la actividad inhibitoria de la ACE y el contenido de nitrógeno peptídico de la fracción menor de 3000 Da en las dos fórmulas infantiles estudiadas, pudieron observarse importantes diferencias. En el producto sin digerir, tanto el porcentaje de inhibición como el contenido de nitrógeno peptídico fueron muy distintos en las dos leches maternizadas. El bajo contenido de péptidos de pequeño tamaño presentes en la fracción obtenida a partir de la muestra LM-1 determinó la baja actividad inhibitoria de la ACE detectada. Sin embargo, ya se ha comprobado que el proceso de hidrólisis de las proteínas de suero, llevado a cabo durante la obtención de la leche LM-7 favoreció la liberación de péptidos de pequeño tamaño y alta actividad.

Tras la hidrólisis con pepsina, en ambas muestras se observó un incremento, tanto en la actividad inhibitoria de la ACE como en el contenido peptídico, siendo este aumento más notable en la leche maternizada LM-1. Este mayor aumento se debió a la acción de la enzima gástrica sobre las proteínas presentes en dicha fórmula. Por el contrario, posiblemente, el menor número de enlaces susceptibles a la acción de la pepsina de los péptidos ya presentes en la muestra LM-7 sin digerir, dio lugar a menores diferencias tanto respecto al nitrógeno peptídico como a la actividad inhibitoria de la ACE.

La acción de la Corolasa PP provocó, en ambas leches maternizadas, un ligero descenso de la actividad inhibitoria de la ACE. Sin embargo, se pudieron detectar diferencias entre ambas fórmulas en cuanto al incremento en el contenido peptídico. Así, en la muestra LM-1, la acción de la tripsina y la quimotripsina provocaron la liberación de un gran número de péptidos de pequeño tamaño, por lo que se observó un destacado incremento del nitrógeno peptídico. En la muestra LM-7, al igual que ocurrió con la pepsina, los péptidos liberados durante su elaboración, no presentaron muchos enlaces susceptibles a la acción de la Corolasa PP, por lo que el aumento del contenido peptídico fue inferior.

Los resultados obtenidos durante la simulación de la digestión gastrointestinal de las leches maternizadas indicaron que la actividad inhibitoria de la ACE de la fracción menor de 3000 Da obtenida a partir de dichas leches tras el proceso completo de digestión fue notablemente superior a la de la fracción obtenida a partir de los productos sin hidrolizar.



### 3.3.5. Aislamiento de péptidos inhibidores de la ACE en un producto lácteo fermentado

Con el objetivo de aislar y caracterizar los péptidos responsables de la actividad inhibitoria de la ACE en los productos lácteos comerciales, se seleccionó uno de estos productos, la leche fermentada líquida LF-5. Esta selección se basó en la mayor actividad inhibitoria de la ACE detectada para este producto en comparación con el resto de los productos lácteos fermentados elaborados con leche de vaca (apartado 3.3.1.). Además, la persistencia de la actividad tras la simulación de la digestión gastrointestinal de este producto fue otro de los criterios en la elección de dicho producto para llevar a cabo la identificación de los péptidos liberados durante el proceso de fermentación y con actividad inhibitoria de la ACE.

Para comprobar si los péptidos de pequeño tamaño eran los responsables de la actividad inhibitoria de la ACE determinada en este producto lácteo fermentado se obtuvieron, siguiendo el método descrito en el apartado 2.3.7., la fracción sérica y los permeados inferiores a 10000 y 3000 Da, mediante ultrafiltración por membrana. En estas fracciones se determinó el nitrógeno total, mediante el método Kjeldahl, el nitrógeno amínico por el método de la ninhidrina-cadmio y el porcentaje de inhibición de la ACE. Los resultados se muestran en la Tabla 24.

**Tabla 24.** *Actividad inhibitoria de la ACE (%), nitrógeno total, amínico y peptídico y relación entre la actividad y el nitrógeno peptídico del extracto soluble en agua y de las fracciones menores de 10000 y 3000 Da de la muestra LF-5*

<b>Muestra</b>	<b>IACE (%)</b>	<b>N<sub>total</sub> (mg/100g)</b>	<b>N<sub>amínico</sub> (mg/100g)</b>	<b>N<sub>peptídico</sub> (mg/100g)</b>
Extracto	74,3	47,0	2,1	44,9
f<10000 Da	74,5	49,0	2,0	47,0
f<3000 Da	74,9	31,0	2,3	28,7

El contenido de nitrógeno total de la fracción sérica obtenida mediante el método detallado en el apartado 3.3.7. fue mayor (47 mg/100 g) al contenido de nitrógeno total determinado en la fracción sérica obtenida tras un proceso de centrifugación más intenso (41 mg/100 g; Tabla 19). El contenido de nitrógeno total en la fracción menor de 10000 Da fue similar al contenido de la fracción sérica, lo que pudo deberse al bajo contenido en proteínas de suero en la fracción sérica de esta muestra, lo que ya se había observado mediante RP-HPLC.

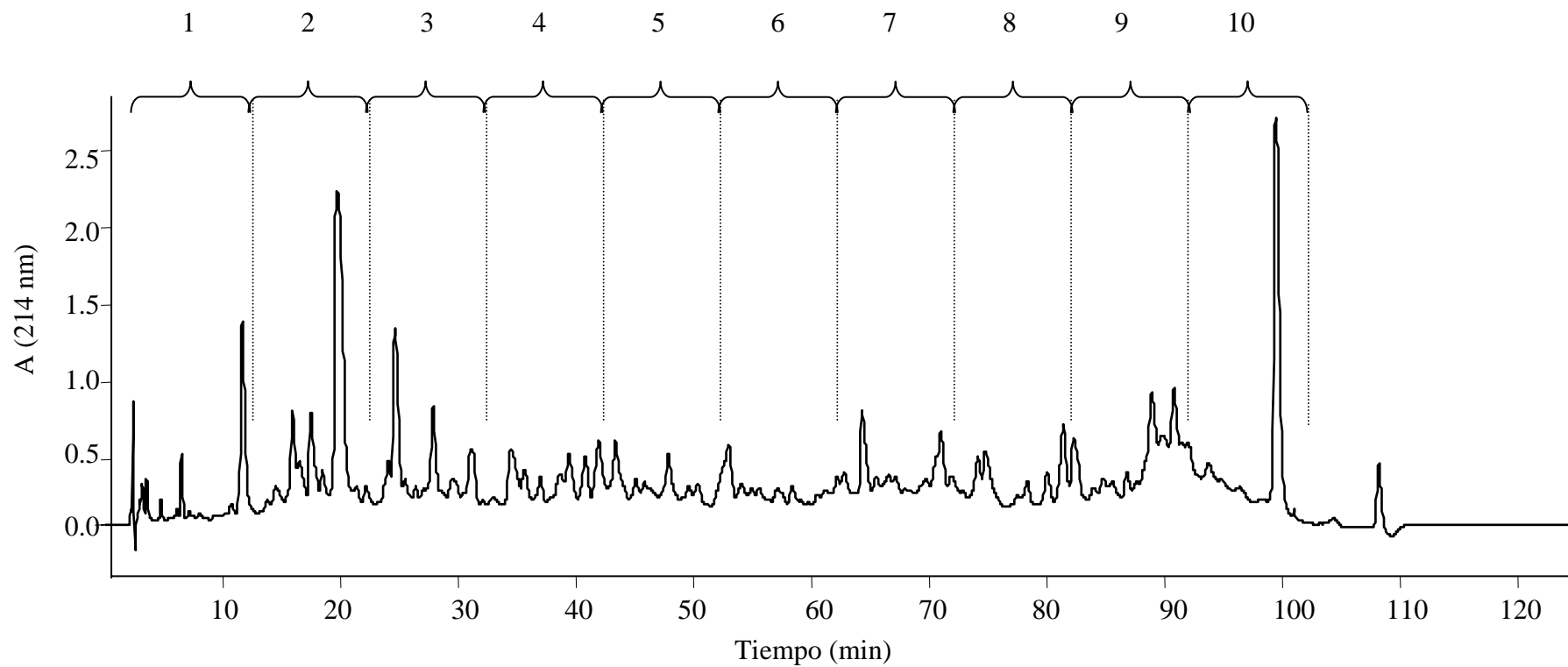
El nitrógeno total de la fracción menor de 3000 Da representó un 66% del nitrógeno total de la fracción sérica, lo que puso de manifiesto el alto contenido de fragmentos de pequeño tamaño presentes en este producto lácteo fermentado y originados durante la fermentación de la leche. Los aminoácidos, debido a su menor tamaño fueron extraídos tanto en la ultrafiltración con membranas de 10000 Da como a través de las membranas de 3000 Da, por lo que el contenido fue similar en el suero y en los dos permeados. También, el porcentaje de inhibición de la ACE fue similar en la fracción sérica y en los dos permeados obtenidos a partir de ella. Sin embargo, la relación entre este porcentaje y el contenido de nitrógeno peptídico fue superior en la fracción menor de 3000 Da (2,6) que en el suero (1,7) y la fracción menor de 10000 Da (1,6). Estos resultados determinaron que los responsables fundamentales de la actividad inhibitoria de la ACE en la leche fermentada LF-5 fueron los péptidos de pequeño tamaño. De manera similar, Mullally y col., (1997b) y Pihlanto-Leppälä y col., (2000) habían determinado la mayor actividad en las fracciones inferiores a 3000 y 1000 Da obtenidas a partir de los hidrolizados de las proteínas de suero.

Sin embargo, al ser similares los porcentajes de inhibición de la ACE en la fracción sérica y en las permeados inferiores a 10000 y 3000 Da y para evitar la pérdida de algún péptido de mayor tamaño con actividad inhibitoria de la ACE durante el proceso de ultrafiltración, se optó por emplear la fracción sérica para llevar a cabo el aislamiento y la caracterización de las fracciones peptídicas responsables de dicha actividad. Previamente, y con el objetivo de purificar dicha fracción se eliminaron los azúcares mediante un proceso de extracción en fase sólida, descrito en el apartado 2.3.7. En esta fracción sérica purificada se determinó la concentración proteica mediante microanálisis y la actividad

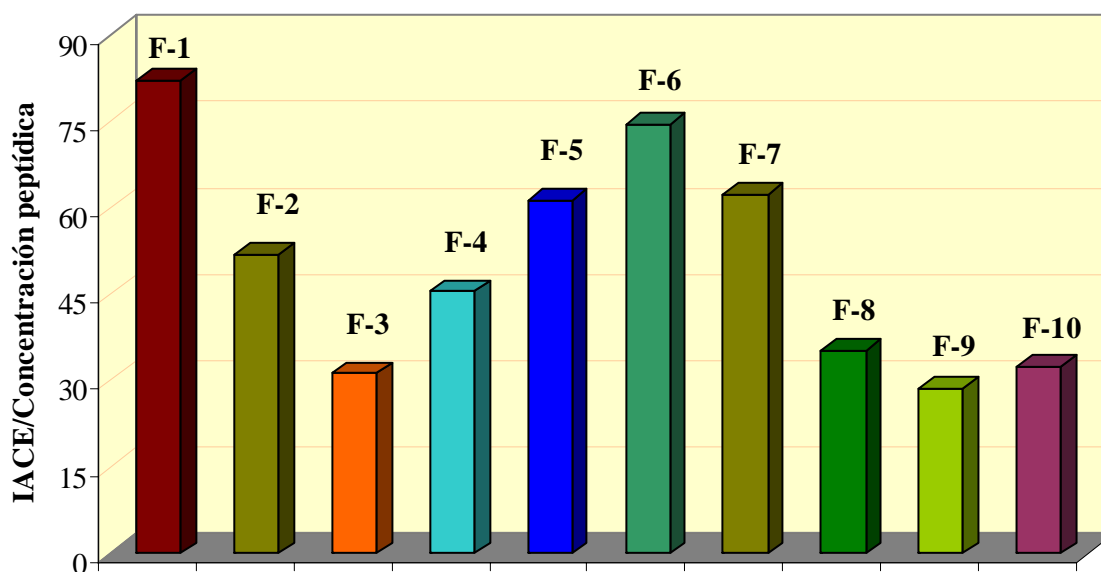
inhibitoria de la ACE, obteniéndose un valor del 77% de proteína y un valor de IC<sub>50</sub> de 145,5 µg de proteína/mL.

Para llevar a cabo el aislamiento y la caracterización de los péptidos con actividad inhibitoria de la ACE, la fracción sérica se fraccionó mediante RP-HPLC a escala preparativa, siguiendo el método descrito en el apartado 2.3.7. En la Figura 36 se muestra el cromatograma obtenido tras este análisis cromatográfico, observándose los picos correspondientes a los péptidos liberados durante la fermentación de la leche, con tiempos de retención entre 0 y 100 minutos. Se recogieron 10 fracciones, enumeradas en el cromatograma del 1 al 10, en intervalos de 10 minutos cada una de ellas. En cada una de estas fracciones, liofilizadas y redisueltas en un volumen de agua destilada 10 veces menor, se determinó el contenido peptídico, mediante el método del BCA y la actividad inhibitoria de la ACE.

La relación entre el porcentaje de inhibición de la ACE y el contenido peptídico de cada una de las fracciones se muestra en la Figura 37. Se observaron importantes diferencias entre las diez fracciones recogidas. Las fracciones enumeradas como F-1, F-5, F-6 y F-7 fueron las que presentaron mayores valores de inhibición de la ACE con respecto al contenido de nitrógeno peptídico, superiores al 60%. Sin embargo, en las fracciones que eluyeron al final del análisis cromatográfico y en la fracción F-3 la actividad inhibitoria de la ACE fue menor, no superando la relación con el contenido peptídico el valor del 35%. La menor actividad inhibitoria de la ACE detectada en las fracciones F-8, F-9 y F-10 pudo ser debida al mayor tamaño de los péptidos presentes en dichas fracciones.



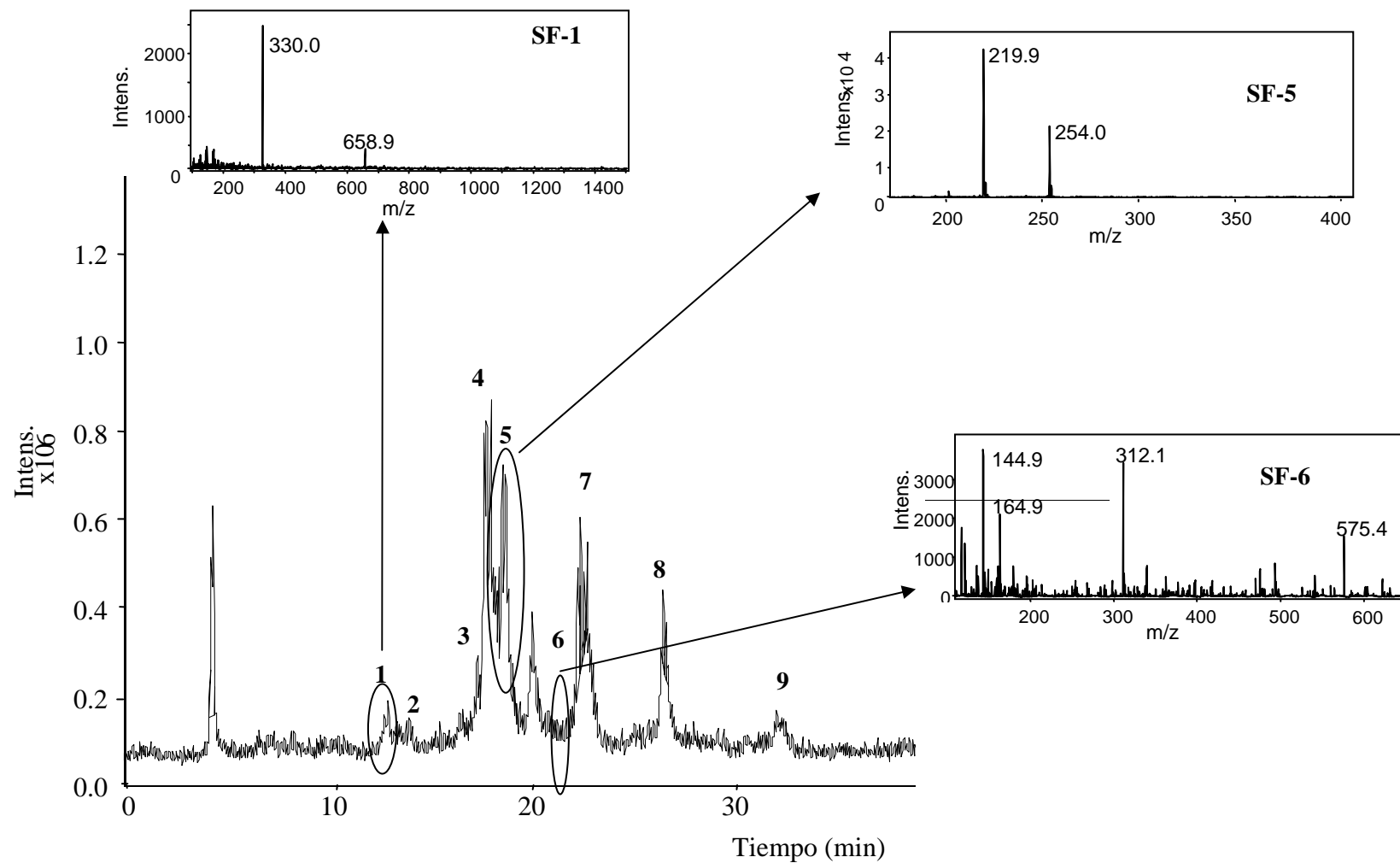
**Figura 36.** Cromatograma de la fracción sérica del producto lácteo fermentado LF-5, obtenido mediante RP-HPLC preparativo. Se enumeran las fracciones recogidas para su posterior análisis



**Figura 37.** Relación entre el porcentaje de inhibición de la ACE y el contenido de péptidos de las fracciones obtenidas a partir del suero del producto lácteo fermentado LF-5

La fracción 1, por su mayor actividad inhibitoria de la ACE fue seleccionada para llevar a cabo la caracterización de los péptidos responsables de esta actividad. Esta fracción fue analizada mediante HPLC-ESI-MS, siguiendo el método descrito en el apartado 2.3.7. En la Figura 38 se muestra el espectro de masas de dicha fracción, así como el cromatograma de iones totales de varias subfracciones. Se observaron 9 subfracciones que se han enumerado del 1 al 9 en el espectro de masas de dicha figura. Los iones moleculares detectados, así como los fragmentos derivados de las caseínas, cuyas masas podrían corresponder a dichos iones se muestran en la Tabla 25.

Los patrones de los tri-péptidos VPP e IPP, descritos en la bibliografía como los péptidos antihipertensivos más potentes aislados a partir de una leche fermentada, fueron analizados mediante HPLC-ESI-MS, empleando las mismas condiciones cromatográficas. Al llevar a cabo la extracción de iones en el cromatograma de la fracción 1 pudo observarse el ión (312,1) correspondiente al péptido VPP en la subfracción 6 (Figura 38).



**Figura 38.** Espectro de masas de la fracción 1 del suero de la leche fermentada LF-5 y cromatograma de iones totales de las subfracciones 1, 5 y 6

**Tabla 25.** Masa molecular, secuencia peptídica y fragmento de los péptidos presentes en la fracción 1 aislada a partir del suero del producto lácteo fermentado LF-5 (n.d., secuencia o fragmento no determinado)

Nº Fracción	Masa observada	Masa calculada <sup>a</sup>	Secuencia peptídica	Fragmento
1	657,9	---	n.d.	n.d.
2	628,1	---	n.d.	n.d.
3	164,9	164,9	F	---
4	253	253,3	GPV PR	---
5	218,9	219,1	NS  SN	$\alpha_{s1}$ -CN f(74-75), f(114-115), f(190-191)  $\alpha_{s2}$ -CN f(134-135)  $\beta$ -CN f(68-69)  $\kappa$ -CN A y B f(80-81)
6	311,1	311,2	VPP	$\beta$ -CN f(84-86)
7	337,1	337,2	RY	$\alpha_{s1}$ -CN f(90-91)  $\beta$ -CN f(170-171), f(205-206)  $\kappa$ -CN A y B f(34-35)
8	144	---	n.d.	n.d.
	183,9	---	n.d.	n.d.
9	449	---	n.d.	n.d.

El producto LF-5 estaba elaborado con los fermentos del yogur y *Lactobacillus casei*. Debido a la acción prioritaria de *Lactobacillus casei* sobre la  $\beta$ -CN (Kunji y col., 1996), el péptido VPP, fragmento f(84-86) podría liberarse tras la acción de esta cepa bacteriana y formar parte de la leche fermentada LF-5. Al determinar el valor del IC<sub>50</sub> del patrón de VPP se obtuvo un valor de 3,4  $\mu$ M. Este péptido, por lo tanto, podría ser el responsable de la alta actividad inhibitoria de la ACE determinada en la fracción 1 (82%) aislada a partir del suero de la leche fermentada LF-5. Nakamura y col., (1995) habían aislado los tri-péptidos VPP e IPP a partir de una leche fermentada con *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae*, determinando el IC<sub>50</sub> cuyo valor fue de 9 y 5  $\mu$ M, respectivamente. Sin embargo, en el cromatograma de la fracción 1 no pudo observarse el ión (326) correspondiente al tri-péptido IPP.

En las fracciones 1 y 2 aparecieron dos iones moleculares, de 658,9 y 629,1, respectivamente, que podrían corresponder a varios fragmentos derivados de las diferentes caseínas. Debido al alto número de fragmentos cuya masa correspondería a estos iones moleculares, no fue posible identificar los péptidos presentes en cada una de estas fracciones. Era necesario llevar a cabo un nuevo análisis mediante MS-MS para identificar los péptidos. Sin embargo, fue posible determinar las secuencias peptídicas correspondientes a los iones moleculares identificados en las subfracciones 5 y 7, de 219,9 y 338,1. Estos fragmentos fueron NS o SN (219,1) y RY (337,2), presentes en la secuencia de todas las caseínas.

Por lo tanto, con estos resultados podríamos indicar que la elevada actividad inhibitoria de la ACE determinada en la fracción 1 aislada a partir del suero de la leche fermentada LF-5 se deba probablemente a la presencia del tri-péptido VPP. Sería necesaria la caracterización mediante MS/MS del resto de los péptidos constituyentes de esta fracción 1, para poder confirmar la contribución de los mismos en la actividad inhibitoria de la ACE. Además, la caracterización de las fracciones F-5, F-6 y F-7, aisladas a partir del suero del producto fermentado y cuya actividad inhibitoria de la ACE fue notable, permitiría la identificación de nuevos péptidos liberados durante el proceso de fermentación y contribuyentes en la actividad determinada en dicho suero.

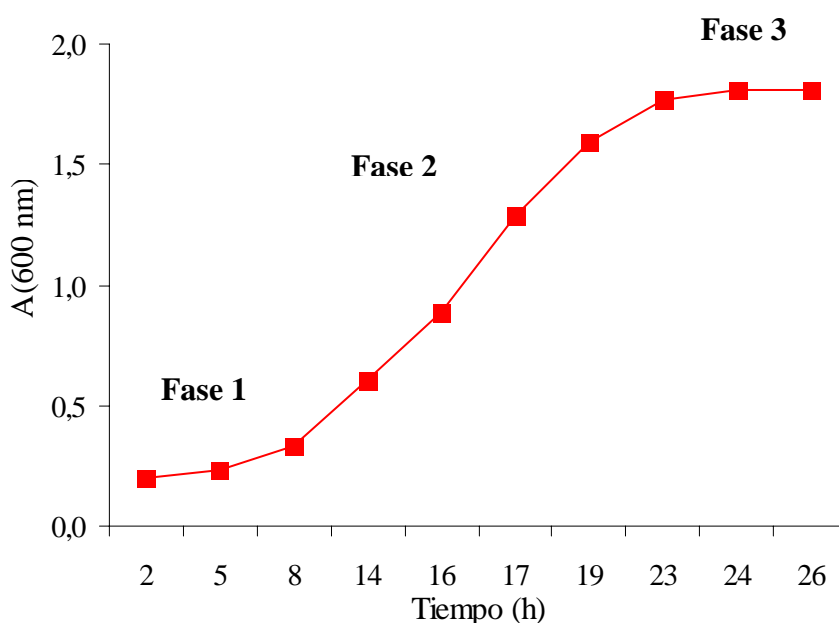


La identificación de péptidos inhibidores de la ACE liberados en el proceso de fermentación de la leche, así como la persistencia de la actividad tras la digestión gastrointestinal permitirían el empleo de este producto lácteo fermentado como alimento funcional, encaminado a la prevención de la hipertensión. Previamente, serían necesarios ensayos tanto en animales de experimentación como en humanos que confirmaran la capacidad antihipertensiva *in vivo* de esta leche fermentada

### 3.4. PREPARACIÓN DE LECHE FERMENTADAS CON ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ACE

En esta parte del trabajo se ha llevado a cabo el estudio de la actividad inhibitoria de la ACE en muestras de leche y de concentrados de proteínas de suero fermentados en el laboratorio con distintas cepas de bacterias lácticas.

Inicialmente y con el fin de estudiar el comportamiento de cada una de las siete cepas que se emplearon en la fermentación de la leche y del concentrado de proteínas de suero, se llevaron a cabo las curvas de crecimiento de dichas cepas en el medio de cultivo adecuado para cada una de ellas. Para ello, se determinó la absorbancia de la suspensión bacteriana a los distintos tiempos de incubación. A modo de ejemplo, en la Figura 39 se muestra la curva de crecimiento correspondiente a la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.



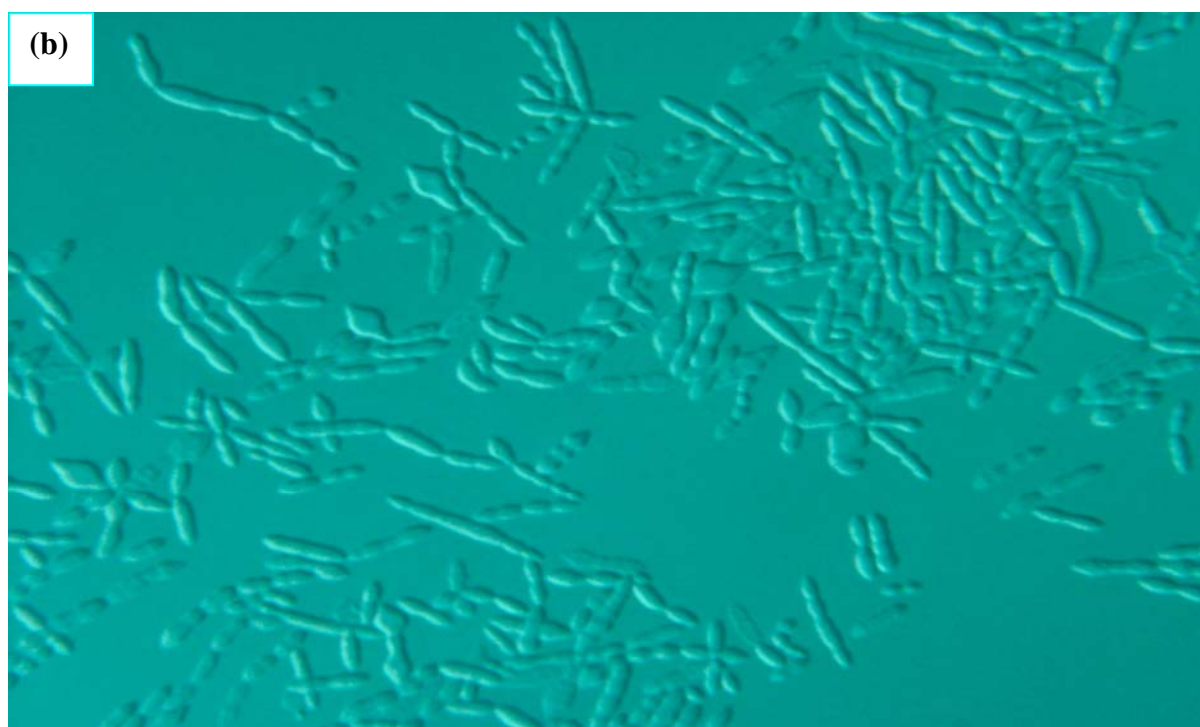
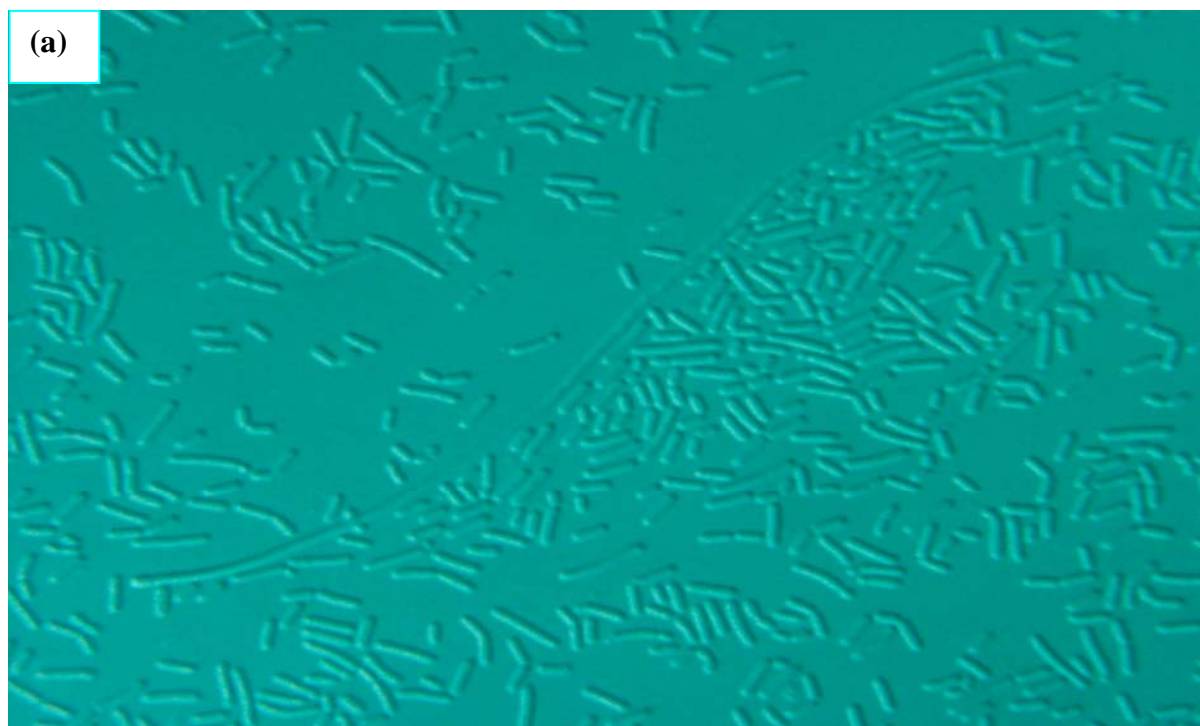
**Figura 39.** Absorbancia con respecto al tiempo de incubación de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en medio MRS líquido

En todas las curvas se observaron las tres etapas características del crecimiento microbiano, variando la duración de cada una de ellas, según la especie y la cepa. En la Figura 39 se observó una primera fase, durante las primeras 8 horas de incubación de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, en la que el incremento de la absorbancia no fue notable. Esta fase también se puso de manifiesto durante la incubación del resto de las cepas bacterianas, con una duración variable entre las 5 horas para *Lactobacillus rhamnosus* y las 9 horas para *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus thermophilus*. Los valores de absorbancia durante esta fase fueron inferiores a 0,3 para todas las cepas estudiadas. La duración de la fase de crecimiento exponencial o logarítmico y el valor máximo de absorbancia alcanzado varió en función de la cepa bacteriana. Así, *Lactobacillus rhamnosus* y *Streptococcus thermophilus* fueron las cepas con mayor velocidad de crecimiento, alcanzando los valores máximos de absorbancia a las 16 horas, siendo estos valores de 3,0 y de 0,6, respectivamente. Para el resto de las cepas el crecimiento no fue tan rápido, por lo que fueron necesarias 24 horas para alcanzar los valores máximos de absorbancia. Para *Streptococcus thermophilus*, pudo observarse, tras una primera fase estacionaria, una segunda fase de crecimiento exponencial, alcanzando valores de absorbancia de 1,0 a las 32 horas.

La fase estacionaria fue claramente visible a partir de las 22-24 horas de incubación en el medio de cultivo de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mostrado en la Figura 39 y *Lactobacillus johnsonii*.

Con la medida de absorbancia se determinó tanto la población microbiana viable como la no viable, obteniendo resultados dependientes del tamaño y de las características estructurales de las colonias, que podrían dar lugar a conclusiones erróneas a la hora de preparar el inóculo para la elaboración de las leches fermentadas. Por ello, se determinó la población bacteriana viable haciendo un recuento del número de colonias en medio sólido a los distintos tiempos de incubación. Para todas las cepas se obtuvieron valores finales en la fase estacionaria de  $10^8$  ufc/mL, variando, en función de la cepa, el tiempo necesario para alcanzar este valor. Esta cantidad se consideró suficiente como inóculo a emplear para llevar a cabo la fermentación de la leche y del concentrado de proteínas de suero.

El estudio de la morfología de las colonias, así como la detección de la presencia de microorganismos contaminantes se llevó a cabo siguiendo el método de microscopía óptica detallado en el apartado 2.4.2. En la Figura 40 se muestran las fotografías tomadas de las colonias de *Lactobacillus casei* y de *Streptococcus thermophilus*. Las diferencias entre las bacterias pertenecientes a estos dos géneros fueron muy notables, y acordes a lo esperado. Los bacilos pertenecientes a la especie *Lactobacillus casei* eran largos, con bordes redondeados y con tendencia a formar largas cadenas, lo que pudo observarse en la fotografía (Figura 40.a). Sin embargo, los cocos pertenecientes a la especie *Streptococcus thermophilus* presentaron formas esféricas u ovoides que formaban, desde parejas hasta largas cadenas (Figura 40.b). Los cultivos obtenidos fueron puros, no observándose microorganismos contaminantes en los cultivos de las cepas de bacterias lácticas seleccionadas en medio sólido.



**Figura 40.** Microfotografías de microscopía óptica interferencial de Nomarsky, de cepas de (a) *Lactobacillus casei* y (b) *Streptococcus thermophilus*

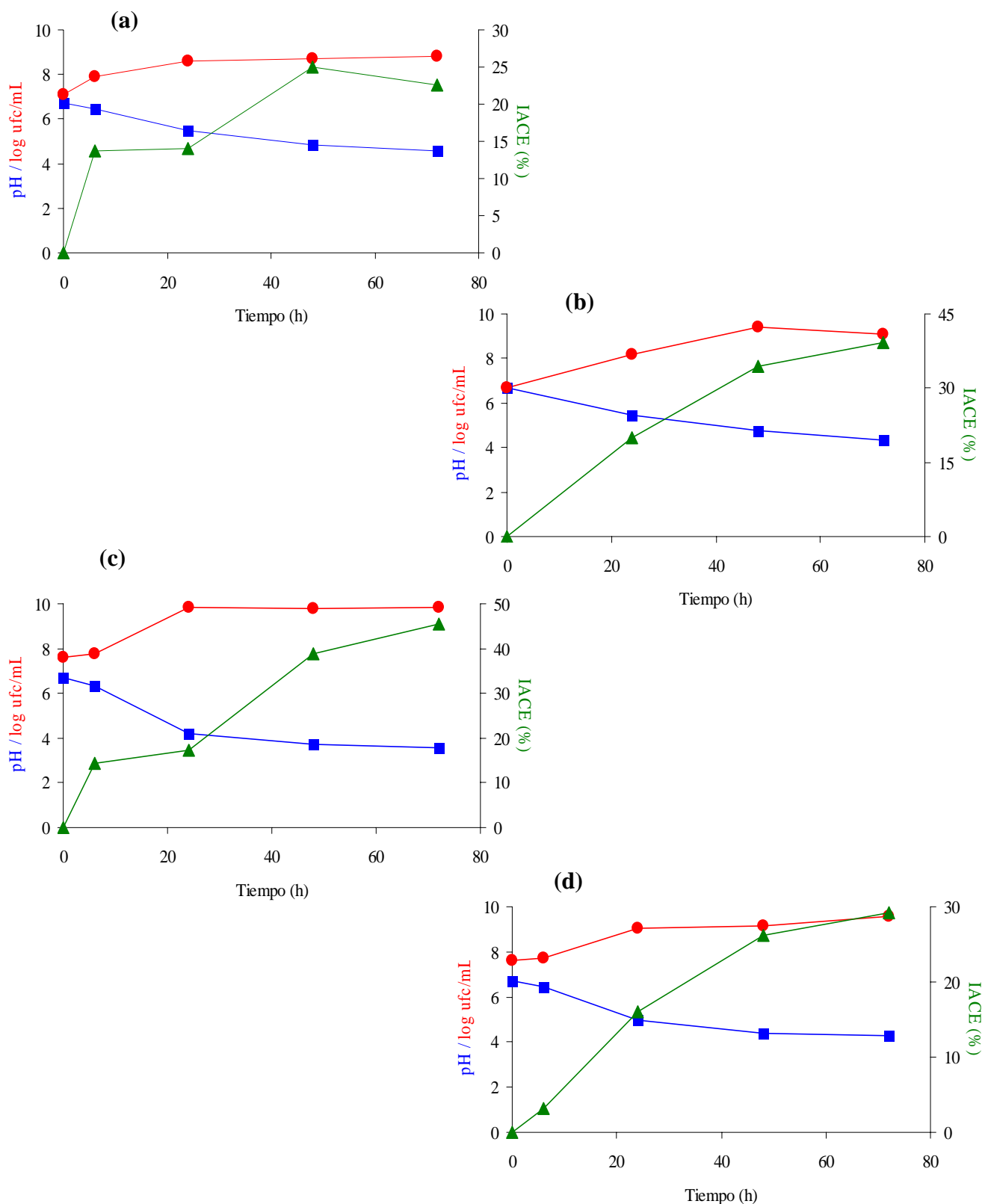
### 3.4.1. Fermentación de leche UHT

La muestra de leche UHT desnatada no presentó actividad inhibitoria de la ACE, lo que ya se había comprobado en el apartado 3.3.1. Debido al tratamiento de esterilización al que había sido sometida dicha muestra de leche, tras la incubación durante 72 horas a 37°C no se observó crecimiento bacteriano ni fúngico en las placas de agar.

Con el propósito de elaborar distintas leches fermentadas, la muestra de leche UHT fue inoculada con las siete cepas de bacterias lácticas anteriormente descritas, siguiendo el método detallado en el apartado 2.4.3. En cada una de las alícuotas de la leche fermentada con cada cepa bacteriana tomadas a los distintos tiempos de incubación, se determinó el pH y la actividad inhibitoria de la ACE y se llevó a cabo el recuento del número de ufc/mL.

En la Figura 41 se muestran los valores de pH, log ufc/mL y del porcentaje de inhibición de la ACE a los distintos tiempos de incubación de las muestras de leche fermentada con *Lactobacillus plantarum* (41.a), *Lactobacillus helveticus* (41.b), *Lactobacillus rhamnosus* (41.c) y *Lactobacillus casei* (41.d). El porcentaje de inhibición de la ACE fue determinado en el suero obtenido a partir de estas leches fermentadas, siguiendo el método descrito en el apartado 2.4.4. Debido al proceso de conversión de la lactosa en ácido láctico, primer papel desempeñado por las bacterias lácticas durante el proceso de fermentación, se produjo el descenso del pH. Se observó que durante las 6 primeras horas de fermentación con estas cuatro cepas, este descenso fue poco acusado, obteniéndose valores de pH en el intervalo entre 6,3 y 6,5. Al llevar a cabo el recuento del número de colonias tras estas primeras 6 horas, no se observó una variación notable con respecto al número de ufc/mL inicial. Este período correspondería a la fase de latencia de los microorganismos, durante la cual las células se adaptaron al nuevo medio y sintetizaron las enzimas necesarias para la fase de crecimiento exponencial.

La fase de crecimiento logarítmico ya pudo observarse en las siguientes 18 horas de incubación de la leche, principalmente con las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus casei*, alcanzándose valores de  $10^8$ - $10^9$  ufc/mL. La mayor velocidad de



**Figura 41.** pH, log ufc/mL y actividad inhibitoria de la ACE (%) con respecto al tiempo de incubación de (a) *Lb. plantarum*, (b) *Lb. helveticus*, (c) *Lb. rhamnosus* y (d) *Lb. casei* en leche UHT

crecimiento de estas cepas ya había sido observada en el medio MRS. Además, durante este tiempo el descenso del pH fue muy acusado, hasta valores de 4,2 y 4,95 para la leche fermentada con *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus casei*, respectivamente. A estos valores de pH, próximos al punto isoeléctrico de las caseínas, se produjo la precipitación de estas proteínas y la consecuente coagulación de la leche. Por el contrario, fueron necesarias 48 horas de fermentación de la leche con *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus helveticus* para observarse la coagulación de la leche, además de un recuento de colonias de  $10^8$  y  $10^9$  ufc/mL, respectivamente. El crecimiento de estas cuatro cepas de bacterias lácticas se mantuvo constante durante las últimas 24 horas del estudio, lo que indicó el comienzo de la fase estacionaria.

En la fracción sérica de las muestras de leche UHT fermentada con las distintas cepas bacterianas y a los distintos tiempos de incubación se determinó la actividad inhibitoria de la ACE. Para todas las cepas, el mayor porcentaje de inhibición de la ACE se determinó en el suero obtenido de la leche fermentada durante 48-72 horas. Probablemente este tiempo de incubación fue necesario para la liberación de aminoácidos libres y péptidos, siendo éstos últimos los responsables de la actividad inhibitoria de la ACE.

En los sueros obtenidos a partir de las muestras de leche fermentada con *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*, los porcentajes de inhibición de la ACE fueron inferiores al 30%, lo que determinó la baja actividad de los péptidos liberados durante el proceso de fermentación de la leche con estas cepas bacterianas. Sin embargo, la fermentación de la leche con las cepas de *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus rhamnosus* permitió la formación, tras 72 horas de incubación, de péptidos inhibidores de la ACE, responsables del 39,3 y del 45,4% de inhibición, respectivamente. Nakamura y col., (1995) habían descrito valores de inhibición de la ACE superiores en un producto obtenido tras la fermentación de la leche con la cepa de *Lactobacillus helveticus* CPN4 y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta mayor actividad descrita por estos autores pudo deberse a la mayor actividad proteolítica de la cepa empleada y/o a la acción combinada con las proteasas de la cepa de levadura.

Los resultados de pH, log ufc/mL y del porcentaje de inhibición de la ACE de la leche UHT fermentada con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus*

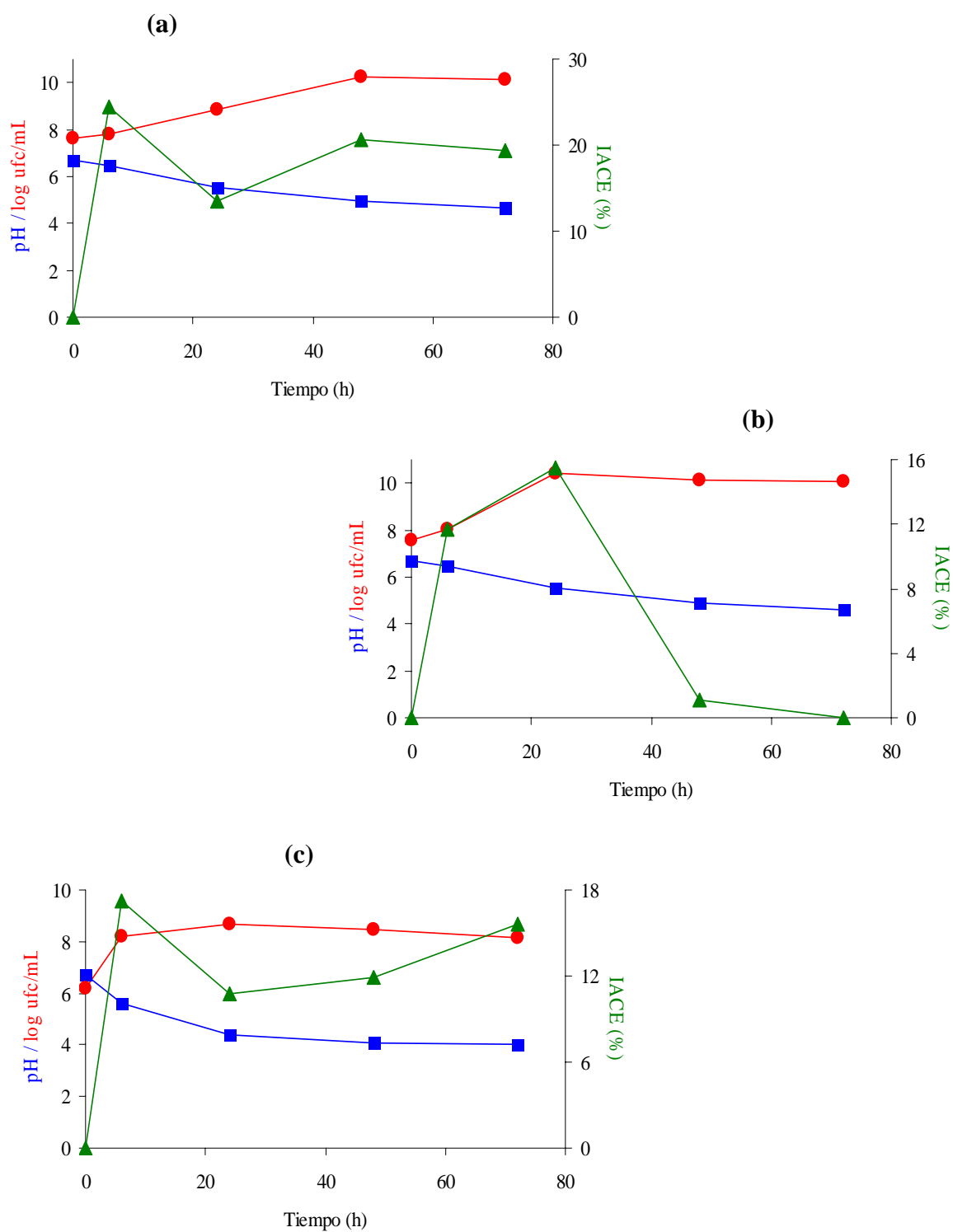


*johnsonii* y *Streptococcus thermophilus* se muestran en la Figura 42. Los resultados de pH fueron similares a los obtenidos con las cuatro cepas anteriores, aunque durante las primeras 6 horas de incubación con *Streptococcus thermophilus* el descenso del pH y el incremento del número de ufc/mL fue más acusado. Sin embargo, el crecimiento exponencial de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *Lactobacillus johnsonii* se produjo en el intervalo entre las 6 y las 24 horas de incubación, alcanzándose valores de  $10^{10}$  ufc/mL en la muestra de leche fermentada con *Lactobacillus johnsonii*. A partir de las 24 horas de incubación comenzó, para todas las cepas, la fase estacionaria.

Los porcentajes de inhibición de la ACE de los sueros de las muestras de leche fermentada con estas tres cepas fueron muy bajos. Esto probablemente se debió a la ausencia de péptidos bioactivos liberados tras la acción de las enzimas proteolíticas de estas bacterias sobre las caseínas. Sin embargo, Gobbetti y col., (2000) habían descrito porcentajes de inhibición próximos al 70% en algunas fracciones peptídicas aisladas por RP-FPLC a partir de una muestra de leche UHT fermentada con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1. Estas diferencias pudieron deberse a la mayor actividad proteolítica o a la distinta especificidad de las enzimas de la cepa bacteriana empleada por estos autores. Se confirma, por tanto, la influencia de la cepa de las bacterias lácticas sobre la concentración y bioactividad de los péptidos formados durante la fermentación de la leche (Matar y Goulet, 1996).

#### **3.4.2. Fermentación de un concentrado de proteínas de suero**

En el concentrado de proteínas de suero, obtenido a partir de un suero de quesería dulce mediante un proceso de ultrafiltración en el laboratorio, se determinó el contenido proteico, mediante el método Kjeldahl, que fue del 34,8% (p/p) y el contenido en lactosa, mediante cromatografía de gases, que fue del 43,7% (p/p). El concentrado de proteínas de suero se disolvió en el tampón fosfato hasta conseguir una concentración final de proteína del 3,5% (p/p) y de lactosa del 4,5% (p/p). Además se aplicó un tratamiento térmico de 85°C durante 5 minutos con el fin de eliminar los microorganismos contaminantes. El pH de esta solución fue de 6,55 y el porcentaje de inhibición de la ACE del 21,7%, lo que puso de manifiesto la presencia de compuestos con actividad inhibitoria de la ACE. Como ya se ha demostrado en el apartado 3.1.3., las proteínas séricas no presentan dicha actividad, por

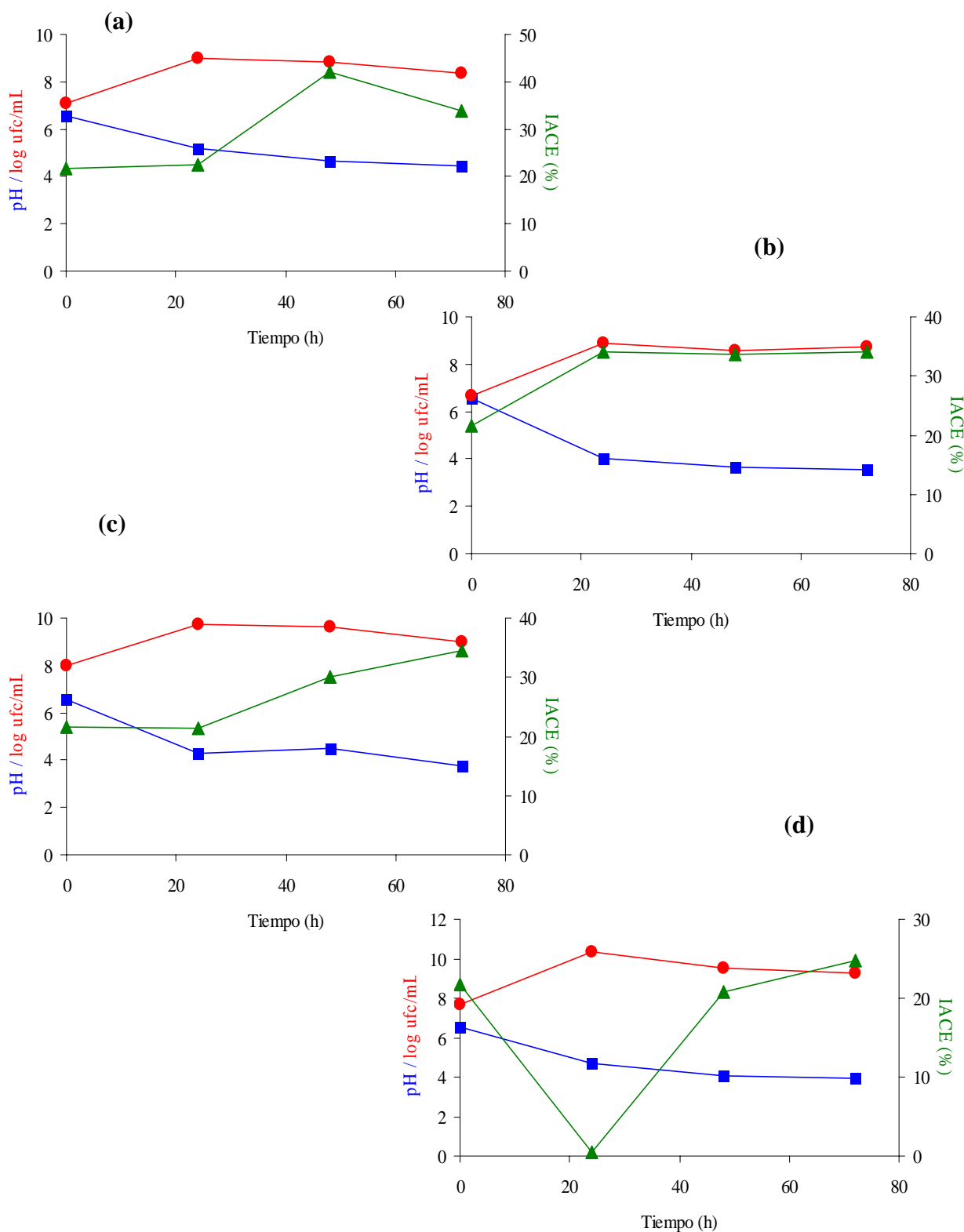


**Figura 42.** pH, log ufc/mL y actividad inhibitoria de la ACE (%) con respecto al tiempo de incubación de (a) *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, (b) *Lb. johnsonii* y (c) *St. thermophilus* en leche UHT

lo que el porcentaje de inhibición observado pudo deberse a la presencia de otros componentes en el suero de quesería como el CMP u otros fragmentos peptídicos procedentes de la hidrólisis de las caseínas que pudieron liberarse rápidamente durante la preparación de la cuajada.

Se llevó a cabo la inoculación del suero con las siete cepas de bacterias lácticas anteriores, siguiendo el mismo método empleado en la fermentación de la leche. Los valores de pH, del log ufc/mL y del porcentaje de inhibición de la ACE en las muestras de concentrado de proteínas de suero fermentado con *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus casei* se muestran en la Figura 43. El contenido en lactosa presente en este concentrado proteico permitió su empleo por las bacterias lácticas y la consecuente formación de ácido láctico, responsable del descenso del pH. Este descenso fue muy acusado durante las primeras 24 horas de incubación, alcanzándose valores de pH desde 4 a 4,6, excepto en el suero inoculado con *Lactobacillus plantarum*, en el cual el pH fue de 5,21. Tras las siguientes horas de fermentación, el pH continuó descendiendo hasta valores inferiores a 4 en todos los sueros fermentados, excepto en el obtenido tras la acción de *Lactobacillus plantarum*. La fase de crecimiento exponencial se produjo durante las primeras 24 horas, obteniéndose un número de  $10^8$  ufc/mL en el suero fermentado con *Lactobacillus helveticus*, de  $10^9$  ufc/mL en el suero inoculado con *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus* y de  $10^{10}$  ufc/mL en el concentrado de proteínas de suero fermentado con *Lactobacillus casei*. Durante esta etapa de crecimiento logarítmico las bacterias lácticas pudieron emplear, como fuente de nitrógeno los aminoácidos libres y/o los péptidos presentes en el suero. A partir de las 48 horas, el crecimiento de *Lactobacillus helveticus* se mantuvo constante y el de las otras tres cepas estudiadas descendió, observándose por tanto, la fase estacionaria y la fase de muerte bacteriana.

Los porcentajes de inhibición de la ACE se incrementaron ligeramente con respecto al determinado en el suero sin inocular, obteniéndose valores en el rango entre el 35 y el 42%, excepto en el suero inoculado con *Lactobacillus casei*, en el cual la actividad no varió. Durante la fase estacionaria los valores de inhibición se mantuvieron o aumentaron ligeramente, excepto en el concentrado inoculado con *Lactobacillus plantarum*, en el cual la máxima actividad (42,2%) se presentó en la muestra tomada a las 48 horas de



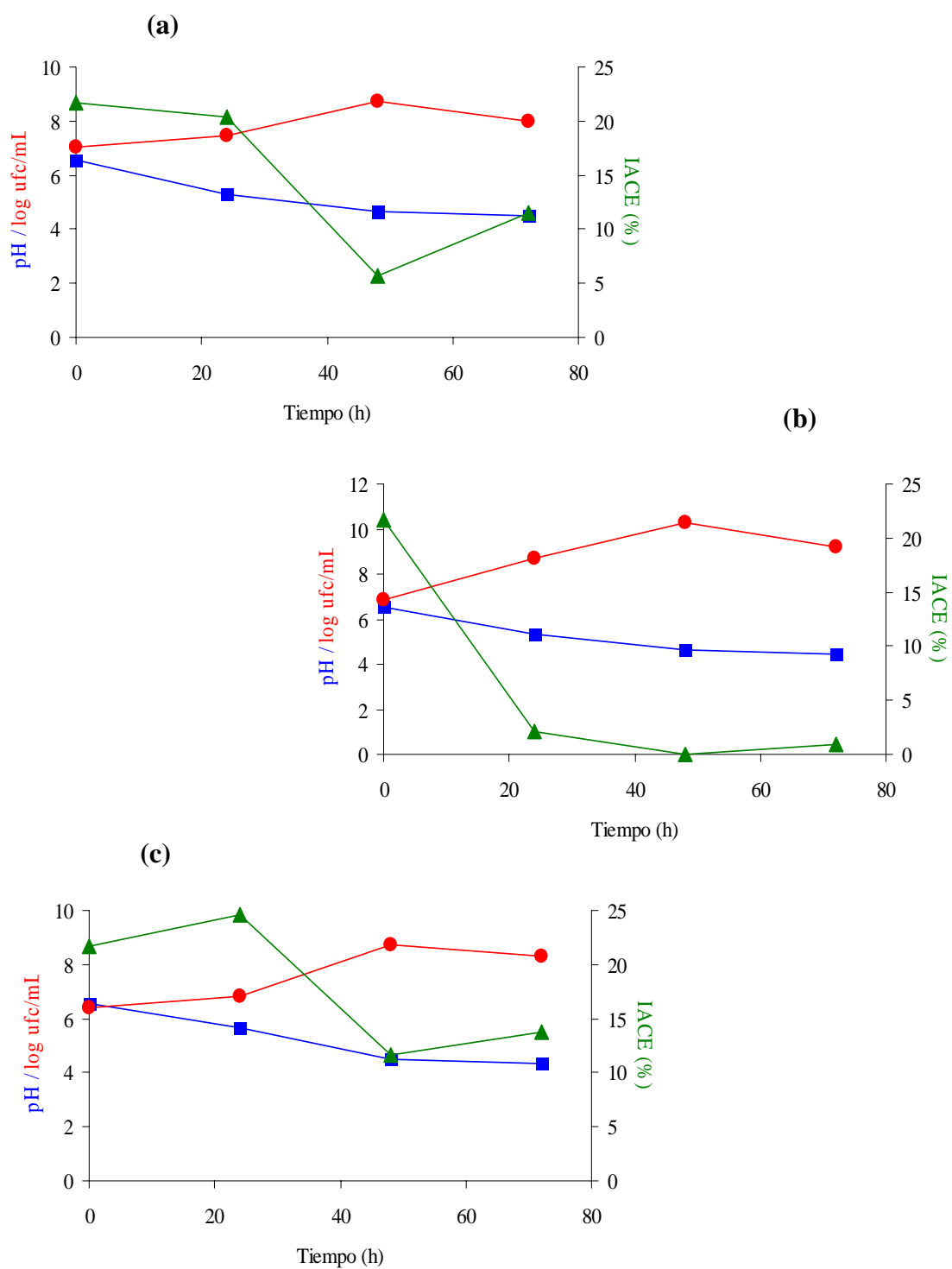
**Figura 43.** pH, log ufc/mL y actividad inhibitoria de la ACE (%) con respecto al tiempo de incubación de (a) *Lb. plantarum*, (b) *Lb. helveticus*, (c) *Lb. rhamnosus* y (d) *Lb. casei* en concentrado de proteínas de suero

fermentación. El ligero incremento de la actividad tras los procesos de lisis celular pudo deberse a la liberación de las enzimas peptidásicas al medio, las cuales accedieron más fácilmente a los péptidos presentes en el suero, liberándose péptidos inhibidores de la ACE.

En la Figura 44 se muestran los valores de pH, log ufc/mL y del porcentaje de inhibición de la ACE de las muestras de concentrados de proteínas de suero fermentados con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus johnsonii* y *Streptococcus thermophilus* a los distintos tiempos de incubación. A diferencia de las cepas anteriormente estudiadas, el crecimiento fue más lento, por lo que fueron necesarias 48 horas para obtener valores de pH de 4,5-4,6 y un número de  $10^8$ - $10^{10}$  ufc/mL. A partir de este tiempo de incubación se observó la fase estacionaria, con un descenso ligero del número de ufc/mL.

Los porcentajes de inhibición de la ACE de los sueros fermentados con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* a las 24 horas se mantuvieron constantes con respecto al de suero sin inocular, descendiendo notablemente a tiempos posteriores. Este descenso pudo deberse a la hidrólisis por parte de los microorganismos de los péptidos bioactivos previamente formados. Este consumo de los péptidos y el consecuente y brusco descenso de la actividad inhibitoria de la ACE pudo observarse en el suero fermentado con *Lactobacillus johnsonii* tras las primeras 24 horas de incubación.

Los resultados de actividad no fueron tan destacados como los obtenidos por otros autores, lo que pudo deberse bien a la distinta actividad y especificidad de las enzimas de las cepas empleadas, así como a la acción conjunta de cepas bacterianas y de levaduras. Por lo tanto, en un futuro, nuestro trabajo se centrará en la fermentación de leche con las cepas de bacterias lácticas que permitieron obtener los mejores resultados de actividad inhibitoria de la ACE, en combinación con distintas cepas de levaduras.



**Figura 44.** pH, log ufc/mL y actividad inhibitoria de la ACE (%) con respecto al tiempo de incubación de (a) *Lb. delbruecki subsp. bulgaricus*, (b) *Lb. johnsonii* y (c) *St. thermophilus* en concentrado de proteínas de suero

## **CONCLUSIONES**

La memoria que se presenta constituye una aportación original en los siguientes aspectos:

1. Se ha comprobado que los hidrolizados de  $\beta$ -Lg ovina y caprina con proteinasa K y termolisina presentan mayor actividad inhibitoria de la ACE (menor valor de  $IC_{50}$ ) que los hidrolizados con tripsina y quimotripsina. Así mismo, se ha comprobado la mayor actividad en los hidrolizados preparados a partir de la  $\beta$ -Lg ovina de suero dulce con respecto a los obtenidos a partir de la proteína de suero ácido, debido probablemente a la contribución en la actividad de los péptidos derivados del CMP.
2. Se han aislado e identificado cuatro péptidos con actividad inhibitoria de la ACE a partir del hidrolizado de  $\beta$ -Lg caprina con termolisina. Dos de estos péptidos, de secuencia LLF y LQKW no habían sido descritos anteriormente y presentaron potente actividad inhibitoria de la ACE.
3. Del estudio de la hidrólisis de la  $\beta$ -Lg bovina con termolisina en condiciones desnaturalizantes, se ha comprobado que la temperatura de incubación influye en la conformación de la proteína y en la consecuente acción enzimática sobre esta proteína. Se han identificado tres péptidos que se forman a temperaturas iguales o superiores a 50°C, pero no se originan si la incubación se lleva a cabo a 37°C. Además, se han identificado cinco secuencias peptídicas derivadas de la  $\beta$ -Lg, que si bien se forman a 37°C, la velocidad de hidrólisis se incrementa al aumentar la temperatura de incubación.
4. Del estudio de los productos lácteos fermentados comerciales, se ha comprobado que el yogur y el kefir, elaborados con leche de cabra y los productos tipo mousse, procedentes de queso fresco, presentan mayor valor de la relación entre la actividad inhibitoria de la ACE y el nitrógeno peptídico. También se detectaron valores elevados de porcentaje de inhibición de la ACE en aquellas leches maternizadas comerciales que habían sido elaboradas con proteínas lácteas hidrolizadas.



5. Se ha comprobado que la simulación de la digestión gastrointestinal de los productos lácteos fermentados y de las leches maternizadas no modifica o incrementa la actividad inhibitoria de la ACE del producto sin digerir. Esto pone de manifiesto la resistencia de los péptidos bioactivos formados durante la elaboración de los productos y/o la formación de nuevos péptidos inhibidores de la ACE tras la acción de las enzimas digestivas. Estos péptidos son fundamentalmente de tamaño inferior a 3000 Da.
  
6. Se han identificado, a partir de uno de los productos lácteos fermentados comerciales seleccionados en el estudio, varios fragmentos peptídicos derivados de las caseínas y entre ellos el péptido de secuencia VPP. Este tri-péptido se había descrito como uno de los péptidos de mayor actividad inhibitoria de la ACE *in vitro* y antihipertensiva *in vivo*.
  
7. La fermentación de leche y de un concentrado de proteínas de suero con distintas cepas de bacterias lácticas ha permitido la obtención en el laboratorio de productos lácteos fermentados, cuyas características y actividad inhibitoria de la ACE dependen de la cepa bacteriana y de las condiciones del proceso de fermentación. Los valores más elevados de actividad inhibitoria de la ACE se han detectado en las muestras de leche fermentada con *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus helveticus*.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. e Itoh, T. (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J. Dairy Sci.*, **81**, 3131-3138.

Addeo, F., Chianese, L., Salzano, A., Sacchi, R., Cappuccio, U., Ferrenti, P. y Malorni, A. (1992). Characterization of the 12% trichloroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese. *J. Dairy Res.*, **59**, 401-411.

Agawa, Y., Lee, S., Ono, S., Aoyagi, H., Ohno, M., Tanoguchi, T., Anzai, K. y Kirino, Y. (1991). Interaction with phospholipid bilayers: ion channel formation, and antimicrobial activity of basic amphipatic  $\alpha$ -helical model peptides of various chain lengths. *J. Biol. Chem.*, **296**, 20218-20222.

Alting, A. C., Meijer, R. J. G. M. y van Bersteijn, E. C. H. (1997). Incomplete elimination of the ABBOS epitope of bovine serum albumin under simulated gastrointestinal conditions of infants. *Diabetes care*, **20**, 875-880.

Angulo, L., López, E. y Lema, C. (1993). Microflora present in kefir grains on the Galician region (north-west of Spain). *J. Dairy Res.*, **60**, 263-267.

Antila, P., Paakkari, I. Järvinen, A., Mattila, M. J., Laukkanen, M. y Pihlanto-Leppälä, A. (1991). Opioid peptides derived from in vitro proteolysis of bovine whey proteins. *Int. Dairy J.*, **1**, 215-229.

Arai, K. I., Murota, K., Hakayama, M., Kataoka, M. y Mituoka, T. (1980). Effects of administration of pasteurized fermented milk to mice on the life-span and intestinal flora. *Journal of Japanese Society of Food and Nutrition*, **33**, 219.

Ariyoshi, Y. (1993). Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends Food Sci. Technol.*, **4**, 139-144.

Azuma, N., Nagaune, S., Ishino, Y., Mori, H., Kaminogawa, S. y Yamauchi, K. (1989). DNA-synthesis stimulating peptides from human  $\beta$ -casein. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2631.

Bakhle, Y. S. (1968). Conversion of angiotensin I to angiotensin II by cell-free extracts of dog lung. *Nature*, **220**, 919-921.

Bartolomé, B., Moreno-Arribas, V., Pueyo, E. y Polo, M.C. (1997). On-line HPLC photodiode array detection and OPA derivatization for partial identification of small peptides from white wine. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3374-3381.

Batt, C. A., Brady, J. y Sawyer, L. (1994). Design improvements of beta-lactoglobulin. *Trends Food Sci. Technol.*, **5**, 261-265.

Baumy, J. J. y Brulé, G. (1988). Binding of bivalent cations to  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin: effect of pH and ionic strength. *Lait*, **68**, 33-48.

Bell, K. y McKenzie, H. A. (1967). The whey proteins of ovine milk:  $\beta$ -lactoglobulins A and B. *Biochim. Biophys. Acta*, **147**, 123-124.

Bell, K., Hopper, K. E. y McKenzie, H. A. (1981). Bovine  $\alpha$ -lactalbumin C and  $\alpha_{s1b}$  and  $\kappa$ -casein of Bali (banteg) cattle, *Bos (Bibos) javanicus*. *Austr. J. Biol. Sci.*, **34**, 149-159.

Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K. y Tomita, M. (1992). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1121**, 130-136.

Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S. y Tomita, M. (1993). Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med. Microbiol. Immunol.*, **182**, 97-105.

Beucher, S., Levenez, F., Yvon, M. y Corring, T. (1994). Effects of gastric digestive products from casein on CCK release by intestinal cells in rat. *J. Nutr. Biochem.*, **5**, 578-584.

Brandsch, M., Brust, P., Neubert, K. y Ermisch, A. (1994).  $\beta$ -casomorphins – chemical signals of intestinal transport systems. En  *$\beta$ -casomorphins and related peptides: recent developments*. Brantl, V. y Teschemacher, H. (eds). Weinheim: VCH. pp. 207-219.

Brantl, V., Teschemacher, H., Henschen, A. y Lottspeich, F. (1979). Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe-Seyler Z. physiol. Chem.*, **360**, 1211-1216.

Briand, L., Chobert, J. M. y Haertlé, T. (1994). Tryptic hydrolysis of sterified  $\beta$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin. *Milchwissenschaft*, **49**, 367-371.

Brownlow, S., Morais Cabral, J. H., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I., North, A. C. T. y Sawyer, L. (1997). Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 Å resolution-still and enigmatic lipocalin. *Structure*, **5**, 481-495.

Brule, G., Roger, L., Fauquant, J. y Piot, M. (1982). Phosphopeptides from casein-based material. *U. S. Pat.*, **4**, 358-465.

Buchheim, W., Heeschen, W. y Schlimme, E. (1994). Definition and differentiation of heat treatments of milk. *Europ. Dairy Magazine*, **1**, 42-44.

Burton, H. (1984). The bacteriological, chemical, biochemical and physical changes that occur in milk at temperatures of 100-150°C. *J. Dairy Res.*, **51**, 341-363.

Butler, J. E. (1974). Immunoglobulins of the mammary secretions. En *Lactation: a comprehensive treatise, Vol. II*. B. L. Larson y V. R. Smith (eds). Academic Press, New York. pp. 217-256.

Caen, J. P., Jollès, P., Fiat, A. M. y Mazoyer, E. (1992). Activité anti-thrombotique de séquences peptidiques de protéines de lait. *Cah. Nutr. Diét.*, **27**, 33-35.

Caligant, A., Dumay, E., Casas Valencia, C., Cuq, J. L. y Cheftel, J. C. (1991). Surface hydrophobicity and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin heated near neutral pH. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 2147.

Cervato, G., Cazzola, R. y Cestaro, B. (1999). Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *International Journal of food sciences and nutrition*, **50**, 291-296.

Chabance, B., Jollès, P., Izquierdo, C., Mazoyer, E., Francoual, C., Drouet, L. y Fiat, A. M. (1995). Characterization of an antithrombotic peptide from  $\kappa$ -casein in newborn plasma after milk ingestion. *Brit. J. Nut.*, **73**, 582-590.

Chabance, B., Marteau, P., Rambaud, J. C., Migliore-Samour, D., Boynard, M., Perrotin, P., Guillet, R., Jollès, P. y Fiat, A. M. (1998). Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk and yogurt. *Biochimie*, **80**, 155-165.

Chang, K. J., Lillian, A., Hazum, E. y Cuatrecasas, P. (1981). Morphicetin: a potent and specific agonist for morphine ( $\mu$ ) receptors. *Science*, **212**, 75-77.

Chaplin, L. C. y Lyster, R. L. J. (1986). Irreversible heat denaturation of bovine  $\alpha$ -lactalbumin. *J. Dairy Res.*, **53**, 249-258.

Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F. y Cushman, D. W. (1980). Binding of peptides substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, **25**, 401-407.

Chiba, H. y Yoshikawa, J. R. (1986). Biologically functional peptides from food proteins. New opioid peptides from milk proteins. En *Protein tailoring for food and medical uses*. Feeney, R. E. y Whitaker, B. J. (eds). Marcel Dekker. New York, pp. 123-153.

Chiba, H., Tani, F. y Yoshikawa, M. (1989). Opioid antagonist peptides derived from  $\kappa$ -casein. *J. Dairy Res.*, **56**, 363-366.

Chobert, J. M., Dalgalarondo, M., Dufour, E., Bertrand-Harb, C. y Haertlé, T. (1991). Influence of pH on the structural changes of  $\beta$ -lactoglobulin studied by tryptic hydrolysis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1077**, 31-34.

Cook, J. J., Huang, T. F., Rucinsky, B., Tuma, R. F., Williams, J. A. y Niewiarowski, S. (1988). Inhibition of platelet hemostatic plug formation by trigramin, a novel RGD-peptide. *Circulation*, **78**, 1248.

Corring, T., Levenez, F., Cuber, J. C., Beaufrère, B., Bories, A., Maubois, J. L., Léonil, J. y Fauquant, J. (1997). Release of CCK in humans after the ingestion of GMP. Abstract, International Whey Conference, American Dairy Products Institute/ International Dairy Federation, Rosemount, Illinois, USA, Oct. 27-29.

Creamer, L. K. y MacGibbon, A. K. H. (1996). Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids. *Int. Dairy J.*, **6**, 539-568.

Creamer, L. K., Parry, D. A. D. y Malcom, G. N. (1983). Secondary structure of bovine  $\beta$ -lactoglobulin B. *Arch. Biochem. Biophys.*, **227**, 98-105.

Cushman, D. W. y Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637-1648.

Cushman, D. W., Cheung, H. S., Sabo, E. F. y Ondetti, M. A. (1977). Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry*, **16**, 5484-5491.

Dalgalarondo, M., Chobert, J. M., Dufour, E., Bertrand-Harb, C., Dumont, J. P. y Haertlé, T. (1990). Characterization of bovine  $\beta$ -lactoglobulin B tryptic peptides by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Milchwissenschaft*, **45**, 212-216.

Dalgalarondo, M., Dufour, E., Chobert, J. M., Bertrand-Harb, C. y Haertlé, T. (1993). Proteolysis of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\beta$ -casein by pepsin in ethanolic media. *Int. Dairy J.*, **5**, 1-14.

Dalgleish, D. G. (1992). The enzymatic coagulation of milk. En *Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins*. P. F. Fox (ed). Elsevier Science Publishers. London, pp. 579-619.

Daniel, H., Vohwinkel, H. y Rehner, G. (1993). Effects of casein and  $\beta$ -casomorphin on gastrointestinal motility in rats. *J. Nutr.*, **120**, 252-257.

Das, M. y Soffer, R. (1975). Pulmonary angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, **250**, 6762-6768.

Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B. y Roberfroid, M. B. (1998). Scientific concepts of functional foods in Europe, consensus document. (FF-27-de98) Bruselas: ILSI Europa, p. 17.

Doi, E., Shibata, D. y Matoba, T. (1981). Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Anal. Biochem.*, **118**, 173-184.

Döring, F., Will, J., Amasheh, S., Clauss, W., Ahlbrecht, H. y Daniel, H. (1998). Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. *J. Biol. Chem.*, **273**, 23211-23218.

Drouet, L., Bal dit Sollier, C., Cissie, M., Pignaud, G., Mazoyer, E., Fiat, A. M., Jollès, P. y Caen, J. P. (1990). The antithrombotic effect of KRDS, a lactotransferrin peptide, compared with RGDS. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, **32**, 59-62.

Dziuba, J., Minkiewicz, P., Nalecz, D. e Iwaniak, A. (1999). Database of biologically active peptides sequences. *Nahrung*, **3**, 190-195.

Ebeler, S. E., Phillips, L. G. y Kinsella, J. E. (1990). Purification of  $\beta$ -lactoglobulin: isolation of genetic variants and influence of purification method on secondary structure. *Milchwissenschaft*, **45**, 694-697.



- Eigel, W. N., Butler, J. E., Ernstrom, C. A., Farrel, H. M. Jr., Harwalkar, V. R., Jenness, R. y Whitney, R. McL. (1984). Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. *J. Dairy Sci.*, **67**, 1599.
- Endo, S. (1962). Studies on protease produced by thermophilic bacteria. *J. Ferment. Technol.*, **40**, 346-353.
- Erdös, E. G. (1975). Angiotensin I-converting enzyme. *Circulation Research*, **36**, 247-255.
- Erdös, E. G. (1976). Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Am. J. Med.*, **60**, 749-759.
- Fazel, A. (1998). Nutritional and health benefits of yogurt and fermented milks. Functional peptides. *Danone World Newsletter*.
- Ferreira, S. H. (1965). *Bri. J. Pharmacol.*, **24**, 163.
- Ferreira, S. H., Bartet, D. C. y Greene, L. J. (1970). Isolation of Bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*, **9**, 2583-2593.
- Fiat, A. M. y Jollès, P. (1989). Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: structural and physiological aspects. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **87**, 5-30.
- Fiat, A. M., Lévy-Toledano, S., Caen, J. P. y Jollès, P. (1989). Biologically active peptides of casein and lactotransferrin implicated in platelet function. *J. Dairy Res.*, **56**, 351-355.
- Fiat, A. M., Migliore-Samour, D., Jollès, P., Drouet, L., Bal dit Sollier, C. y Caen, J. (1993). Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J. Dairy Sci.*, **76**, 301-310.
- Fontana, A. (1988). Structure and stability of thermophilic enzymes. Studies on thermolysin. *Biophys. Chem.*, **29**, 181-193.

Fox, P. F. y Flynn, A. (1994). Biological properties of milk proteins. En *Dairy Products in Human Health and Nutrition*, Serrano Ríos y col. (eds). Bolkema, Rotterdam, pp. 97-111.

Fujita, H., Yokoyama, K. y Yoshikawa, M. (2000). Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *J. Food Sci.*, **65**, 564-569.

Füller, R. (1992). En *Probiotics. The scientific basis*. Chapman y Hall (eds). Londres, p. 1.

Galley, J. A. (1973). Structure of immunoglobulins in the antigens, vol. I. M. Sela (ed). Academic Press, New York.

Gallop, M. A., Barrett, R. W., Dower, W. J., Fodor, S. P. A. y Gordon, E. M. (1994). Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 1. Background and peptide combinatorial libraries. *J. Med. Chem.*, **37**, 1233-1251.

Gibson, G. R. y Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, **125**, 1401-1412.

Gill, I., López-Fandiño, R., Jorba, X. y Vulfson, E. N. (1996). Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme and Microbial Technology*, **18**, 162-183.

Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F. y Addeo, F. (2000). Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *App. Environ. Microbiol.*, **66**, 3898-3904.

Godovac-Zimmermann, J. y Brautnizer, G. (1987). Modern aspects of the primary structure and function of  $\beta$ -lactoglobulins. *Milchwissenschaft*, **42**, 294.

- Gordon, E. M., Barrett, R. W., Dower, W. J., Fodor, S. P. A. y Gallop, M. A. (1994). Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies and future directions. *J. Med. Chem.*, **37**, 1385-1401.
- Hadden, J. W. (1991). Immunotherapy of human immunodeficiency virus infection. *Trends Pharmaceutical Sci.*, **12**, 107-111.
- Haileselassie, S. S., Lee, B. H. y Gibbs, B. F. (1999). Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese. *J. Dairy Sci.*, **82**, 1612-1617.
- Hambling, S. G., McAlpine, A. S. y Sawyer, L. (1992).  $\beta$ -lactoglobulin. En *Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins*. P. F. Fox (ed). Elsevier Science Publishers. London, pp. 141-190.
- Hamel, U., Kielwein, G. y Teschemacher, H. (1985).  $\beta$ -casomorphin immunoreactive materials in cow's milk incubated with various bacterial species. *J. Dairy Res.*, **52**, 139-148.
- Hansen, J. E., Lund, O., Engelbrecht, J., Bohr, H. y Nielsen, J. O. (1995). Prediction of O-glycosylation of mamalian proteins: specificity patterns of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase. *Biochem. J.*, **308**, 801-813.
- Hara, H., Funabiki, R., Iwata, M. y Yamazaki, K. (1984). Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained condition. *J. Nutr.*, **114**, 1122-1129.
- Harwalkar, V. R. y McMahon, D. J. (1993). Symposium: biological and food functional characteristics of milk protein hydrolysis products. *J. Dairy Sci.*, **76**, 300.
- Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y. y Takano, T. (1996). A placebo controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, **64**, 767-771.

Hazato, T. y Kase, R. (1986). Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from porcine plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **13**, 52-55.

Hiraoka, Y., Segawa, T., Kuwagina, K., Sugai, S. y Murai, N. (1980).  $\alpha$ -lactalbumin: a calcium metalloprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 1098-1104.

IDF. (1993). Determinación del contenido total en nitrógeno de la leche por el método Kjeldahl. IDF Standard 20B.

Janatova, J., Fuller, J. K. y Hunter, M. J. (1968). The heterogeneity of bovin albumin with respect to sulfhydryl and dimer content. *J. Biol. Chem.*, **243**, 3612-3622.

Jezova, D., Tokarev, L., Kostalova, L. y Strbak, V. (1996). Presence of atriopeptin-like immunoreactivity in human and rat milk. *Gen. Physiol. Biophys.*, **15**, 333-338.

Jiang, H., Grieve, P. A., Marschke, R. J., Wood, A. F., Dionysius, D. A. y Alewood, P. F. (1998). Application of tandem mass spectrometry in the characterisation of flavour and bioactive peptides. *Aust. J. Dairy Technol.*, **53**, 119.

Jollès, P., Lévy-Toledano, S., Fiat, A. M., Soria, C., Gillensen, D., Thomaidis, A., Dunn, F. W. y Caen, J. P. (1986). Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from  $\kappa$ -casein on platelet function. *Europ. J. Biochem.*, **158**, 379-382.

Juillard, V., Laan, H., Kunji, E. R. S., Jeronimus-Stratingh, C. M., Bruins, A. P. y Konings, W. N. (1995). The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes  $\beta$ -casein into more than one hundred different oligopeptides. *Journal of Bacteriology*, **177**, 3472-3478.

Kang, J. H., Lee, M. K., Kim, K. L. y Hahm, K. S. (1996). Structure-biological activity relationship of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin. *International Journal of Peptide Research*, **48**, 357-363.

- Karaki, H., Doi, K., Sugano, S., Uchiwa, H., Sugai, R. y Murakami, U. (1990). Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **96C**, 367-371.
- Kayser, H. y Meisel, H. (1996). Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from milk proteins. *FEBS Lett.* **383**, 18-20.
- Kenny, A. J. y Maroux, S. (1982). Topology of microvillar membrane hydroliases of kidney and intestine. *Physiol. Rev.*, **62**, 91-128.
- Kim, S. K., Byun, H. G., Park, P. J. y Shahidi, F. (2001). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 2992-2997.
- Kim, Y. K., Chung, B. H., Yoon, S., Lee, K. K., Lönnerdal, B. y Yu, D. Y. (1997). High level expression of human  $\alpha_{s1}$ -casein in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Tech.*, **11**, 675-678.
- Kim, Y. K., Yoon, S., Yu, D. Y., Lönnerdal, B. y Chung, B. H. (1999). Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human  $\alpha_{s1}$ -casein expressed in *Escherichia coli*. *J. Dairy Res.*, **66**, 431-439.
- Kim, Y. S., Bertwhistle, W. y Kim, Y. W. (1972). Peptide hydrolyses in the brush border and soluble fractions of small intestinal mucosa of rat and man. *Journal of Clinical Investigation*, **51**, 1419-1430.
- Kohama, Y., Matsumoto, S., Oka, H., Terramoto, T., Okabe, M. y Mimura, T. (1988). Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **155**, 332-337.
- Kohama, Y., Oka, H., Kayamori, Y., Tsujikawa, K., Mimura, T., Nagase, Y. y Satake, M. (1991). Potent synthetic analogues of angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from tuna muscle. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2169-2170.

Kohmura, M., Nio, N. y Ariyoshi, Y. (1990a). Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptide fragments of various  $\beta$ -caseins. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1101-1102.

Kohmura, M., Nio, N. y Ariyoshi, Y. (1990b). Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptide fragments of human  $\kappa$ -casein. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 835-836.

Kohmura, M., Nio, N., Kubo, K., Minoshima, Y., Munekata, E. y Ariyoshi, Y. (1989). Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human  $\beta$ -casein. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2107-2114.

Korhonen, H., Pihlanto-Leppälä, A., Rantamäki, P. y Tupasela, T. (1998). Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends Food Sci. Technol.*, **9**, 307-319.

Kunji, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. y Konings, W. N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**, 187-221.

Kuwabara, Y., Nagai, S., Yoshimitsu, N., Nakagawa, I., Watanabe, Y. y Tamai, Y. (1995). Antihypertensive effect of the milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **80**, 294-295.

Laffan, R. J., Goldberg, M. E., High, J. P., Schaffer, T. R., Waugh, M. H. y Rubin, B. (1978). Antihypertensive activity in rats of SQ 14,225, an orally active inhibitor of angiotensin I converting enzyme. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **204**, 281-288.

Lahov, E. y Regelson, W. (1996). Antibacterial and stimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chem. Toxic.*, **34**, 131-145.

Larson, B. L., Heary, J. R. y Devery, J. E. (1980). Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. *J. Dairy Sci.*, **63**, 665-671.

Law, A. J. R. (1995). Heat-denaturation of the whey proteins in the milk of the cow, goat and sheep. *Milchwissenschaft*, **50**, 384.

- Law, J. y Haandrikman, A. (1997). Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, **7**, 1-11.
- Law, A. J. R., Leaver, J., Banks, J. M. y Horne, D. S. (1993). Quantitative fractionation of whey proteins by gel permeation FPLC. *Milchwissenschaft*, **48**, 663-666.
- Law, A. J. R., Horne, D. S., Banks, J. M. y Leaver, J. (1994). Heat induced changes in the whey proteins and caseins. *Milchwissenschaft*, **49**, 125-129.
- Lee, Y. K. y Salminen, S. (1995). The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, **6**, 241-245.
- Lehninger, A. L. (1991). Proteínas: esqueleto covalente y secuencia aminoacídica. En *Bioquímica*. Omega, S. A. (ed). Ingoprint, S. A. Barcelona, España. pp. 73-96.
- Leporanta, K. (2001). Developing fermented milks into functional foods. *Innovations in Food Technology*, **10**, 46-47.
- Loukas, S., Varaucha, D., Zioudrou, C., Streaty, R. A. y Klee, W. A. (1983). Opioid activities and structures of alpha-casein-derived exorphins. *Biochemistry*, **22**, 4567-4573.
- Maeno, M., Yamamoto, N. y Takano, T. (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.*, **79**, 1316-1321.
- Marshall, V. W. y Tamime, A. Y. (1997). Starter cultures employed in the manufacture of biofermented milks. *International Journal of Dairy Technology*, **50**, 35-41.
- Maruyama, S. y Suzuki, H. (1982). A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1393-1394.

Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. y Suzuki, H. (1985). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1405-1409.

Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N. y Suzuki, H. (1987a). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of  $\alpha_{s1}$ -casein. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2557-2561.

Maruyama, S., Mitachi, H., Tanaka, H., Tomizuka, N. y Suzuki, H. (1987b). Studies of the active site and antihypertensive activity of angiotensin-I-converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1581-1586.

Maruyama, S., Miyoshi, S., Kaneko, T. y Tanaka, H. (1989a). Angiotensin I- converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1077-1081.

Mason, S. (1962). Some aspects of gastric function in the newborn. *Arch. Dis. Child.*, 387-391.

Matar, C. y Goulet, J. (1996).  $\beta$ -casomorphins 4 from milk fermented by a mutant of *Lactobacillus helveticus*. *Int. Dairy J.*, **6**, 383-397.

Matar, C., Nadathur, S. S., Bakalinski, A. T. y Goulet, J. (1997). Antimutagenic effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* L89 and a protease-deficient derivative. *J. Dairy Sci.*, **80**, 1965-1970.

Matsufuji, H., Matsui, T., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M. y Osajima, Y. (1994). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolysate derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2244-2245.



Matsumura, N., Fujii, M., Takeda, Y., Sugita, K. y Shimizu, T. (1993). Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1743-1744.

Mazoyer, E., Lévy-Toledano, S., Rendu, F., Hermant, L., Lu, H., Fiat, A. M., Jollès, P. y Caen, J. (1990). KRDS, a new peptide derived from human lactotransferrin, inhibits platelet aggregation and release reaction. *Eur. J. Biochem.*, **194**, 43-49.

Meisel, H. (1986). Chemical characterization and opioid activity of an exorphin isolated from *in vivo* digests of casein. *FEBS Lett.*, **196**, 223-227.

Meisel, H. (1993a). En *New Perspectives in infant nutrition*. G. Sawatzki y B. Renner (eds). Thieme, Stuttgart. pp. 153-159.

Meisel, H. (1993b). En *Food Proteins-structure and functionality*. K. D. Schwenke y R. Mothes (eds). VCH, Weinheim, New York. pp. 67-75.

Meisel, H. (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *Int. Dairy J.*, **8**, 363-373.

Meisel, H. y Bockelmann, W. (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie van Leewenhoek.*, **76**, 207-215.

Meisel, H. y Frister, H. (1988). Chemical characterization of a caseinophosphopeptide isolated from *in vivo* digests of a casein diet. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.*, **369**, 1275-1279.

Meisel, H. y Schlimme, E. (1994). Inhibitors of angiotensin I-converting enzyme derived from bovine casein (casokinins). In  *$\beta$ -casomorphins and related peptides: Recent Developments*. V. Brantl and H. Teschmacher (eds.), VCH-Weinheim, Germany, pp. 27-33.

Meisel, H., Behrens, S. y Schlimme, E. (1991). *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, **43**, 199-212.

Meisel, H., Frister, H. y Schlimme, E. (1989). Biologically active peptides in milk proteins. *Z. Ernährungswiss.*, **28**, 267-278.

Meisel, H., Goepfert, A. y Gunther, S. (1997). ACE inhibitory activities in milk products. *Milchwissenschaft*, **52**, 307-311.

Mierau, I., Kunji, E. R. S., Venema, G. y Kok, J. (1997). Casein and peptide degradation in lactic acid bacteria. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **14**, 279-301.

Mierke, D. F., Nöbner, G., Schiller, P. W. y Goodman, M. (1990). Morphinetin analogs containing 2-aminocyclopentane carboxylic acid as a peptidomimetic for proline. *International Journal of Peptide Research*, **35**, 34-45.

Migliore-Samour, D., Floc'h, F. y Jollès, P. (1989). Biologically active peptides implicated in immunomodulation. *Int. Dairy Res.*, **56**, 357-362.

Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. y Maruyama, S. (1991). Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an alpha-zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1313-1318.

Molina, E. (1997). Estudio de la fracción proteica en quesos de leche de diferentes especies mediante técnicas electroforéticas y cromatográficas y su combinación con técnicas inmunológicas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Mullally, M. M., Meisel, H. y Fitzgerald, R. J. (1996). Synthetic peptides corresponding to  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.*, **377**, 259-260.

Mullally, M. M., Meisel, H. y Fitzgerald, R. J. (1997a). Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *FEBS Lett.*, **402**, 99-101.

- Mullally, M. M., Meisel, H. y Fitzgerald, R. J. (1997b). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *Int. Dairy J.*, **7**, 299-303.
- Murakami, L., Andree, J. P. y Berliner, L. J. (1982). Metal ion binding to  $\alpha$ -lactalbumin species. *Biochemistry*, **21**, 5488-5494.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. y Takano, T. (1995). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J. Dairy Sci.*, **78**, 1253-1257.
- Neurath, H (1989). The diversity of proteolytic enzymes. En *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Beynon, R. J. y Bond, J. S. (eds). pp. 232-240.
- Ng-Kwai-Hang, K. F. y Grosclaude, F. (1992). Genetic polymorphism of milk proteins. En *Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins*. P. F. Fox (ed). Elsevier Science Publishers. London, pp. 405-455.
- Ng-Kwai-Hang, K. F. y Vane, J. R. (1970). Some properties of angiotensin converting enzyme in the lung *in vivo*. *Nature*, **225**, 1142-1144.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. y von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, **10**, 1-6.
- Nurminen, M. L., Sipola, M., Kaarto, H., Pihlanto-Leppälä, A., Piilola, K., Korpela, R., Tossavainen, O., Coronen, H. y Vapaatalo, H. (2000).  $\alpha$ -lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life sci.* **66**, 1535-1543.
- Okamoto, A., Hanagata, H., Matsumoto, E., Kawamura, Y., Koizumi, Y. y Yanagida, F. (1995). Angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of various fermented milks. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1147-1149.

Okitsu, M., Morita, A., Kakitani, M., Okada, M. y Yokogoshi, H. (1995). Inhibition of the endothelin-converting enzyme by pepsin digests of food proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 325-326.

Ondetti, M. A. y Cushman, D. W. (1982). Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 283-308.

Ondetti, M. A., Rubin, B. y Cushman, D. W. (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science*, **196**, 441-444.

Ondetti, M. A., Williams, N. J., Sabo, E. F., Pluscec, J., Weaver, E. R. y Kocy, O. (1971). Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure and synthesis. *Biochemistry*, **10**, 4033-4039.

Osajima, K., Nakashima, M. y Osajima, Y. (1994). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolysate derived from sardine muscle. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 2244-2245.

Otte, J., Zakora, M., Qvist, K. B., Olsen, C. E. y Barkholt, V. (1997). Hydrolysis of bovine  $\beta$ -lactoglobulin by various proteases and identification of selected peptides. *Int. Dairy J.*, **7**, 835-848.

Pagelow, I. y Werner, H. (1986). Immunomodulation by some oligopeptides. *Methods and Findings of Experimental Clinical Pharmacology*, **8**, 91-95.

Papiz, M. Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E. E., North, A. C. T., Findlay, J. B. C., Sivraprasadarao, R., Jones, T. A., Newcomer, M. E. y Kraulis, P. J. (1986). The structure of beta-lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, **324**, 383-385.

- Parker, F., Migliore-Samour, D., Floc'h, F., Zerial, A., Wemer, G. H., Jollès, J., Casaretto, M., Zahn, H. y Jollès, P. (1984). Immunostimulating hexapeptide from human casein: aminoacid sequence, synthesis and biological properties. *Europ. J. Biochem.*, **45**, 677-682.
- Paroli, E. (1988). Opioid peptides from food (the exorphins). *World Review of Nutrition and Diets*, **55**, 58-97.
- Perdigon, G., Álvarez, S. y Pesce de Ruiz Holgado, A. (1991). Oral immune adjuvant activity of *L. casei* influence of the dose administered on the secretory immune response. *J. Dairy Res.*, **50**, 485-496.
- Pérez, M. D. y Calvo, M. (1995). Interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a posible biological function for this protein: a review. *J. Dairy Sci.*, **78**, 978-988.
- Permyakov, E. A., Yarmolenko, V. V., Kalinichenko, L. P., Morozova, L. A. y Burnstein, E. A. (1981). Calcium binding to  $\alpha$ -lactalbumin: structural rearrangemnts and association constant. *Biochem. Biphys. Res. Commun.*, **100**, 191-197.
- Peters, T. (1995). Serum albumin. *Adv. Protein Chem.*, **37**, 161.
- Pharmacia A. B. (1984). IEF and electrophoretic titration curve analysis. *PhastSystem Separation Technique File n° 100*.
- Pharmacia A. B. (1986). Fast Coomassie Staining. *PhastSystem Develoment Technique File n° 200*.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci. Technol.*, **11**, 347-356.
- Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T. y Korhonen, H. (2000). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *J. Dairy Res.*, **67**, 53-64.

Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T. y Korhonen, H. (1998). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from bovine milk proteins. *Int. Dairy J.*, **8**, 325-331.

Poolman, B., Kunji, E. R. S., Hagting, A., Juillard, V. y Konings, W. N. (1995). The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *Society for Applied Bacteriology symposium series*, 2465S-2475S.

Recio, I. y Olieman, C. (1996). Determination of denatured serum proteins in the casein fraction of heat treated milk by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, **17**, 1228-1233.

Recio, I. y Visser, S. (1999a). Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine  $\alpha_{s2}$ -casein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1428**, 314-326.

Recio, I. y Visser, S. (1999b). Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin. In situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane. *Journal of chromatography A*, **831**, 191-201.

Reddy, M. I., Kella, N. K. D. y Kinsella, J. E. (1988). Structural and conformational basis of the resistance of  $\beta$ -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 737-741.

Reed, R. G., Putnam, F. W. y Peters, T. Jr. (1980). Sequence of residues 400-403 of bovine serum albumin. *Biochemical J.*, **191**, 867-868.

Reynolds, E. (1987). International Patent Application WO87/07615 A1.

Ribadeau-Dumas, B. (1993). Protéines du lait: structure et fonctions. En *Biologie de la lactation*. J. Martinet y L. M. Houdebine (eds). INRA. pp. 491-516.

Riera, F. A., Álvarez, R., Arguello, M. A. y Cabero, M. (1996). Fraccionamiento y aprovechamiento de proteínas del suero lácteo (I). *ILE*, **206**, 49-61.

- Roberfroid, M. (1999). Functional foods. *Danone World Newsletter*, **18**, 1-12.
- Rohrbach, M. S., Williams, E. B. y Rolstad, R. A. (1981). Purification and substrate specificity of bovine angiotensin converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, **256**, 225-230.
- Rokka, T., Syväoja, E. L., Tuominen, J. y Korhonen, H. (1997). Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GG fermented UHT milk. *Milchwissenschaft*, **52**, 675-677.
- Roudot-Algaron, F., Le Bars, D., Kerhoas, L., Einhorn, J. y Gripon, J. C. (1994). Phosphopeptides from Comté cheese: nature and origin. *J. Food Sci.*, **59**, 544-547.
- Ryhänen, E-V., Pihlanto-Leppälä, A. y Pahkala, E. (2001). A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *Int. Dairy J.*, **11**, 441-447.
- Saito, T., Abubakar, A., Itoh, T., Arai, I. y Aimar, M. V. (1997). Development of a new type of fermented cheese whey beverage with inhibitory effects against angiotensin-converting enzyme. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, **48**, 15-23.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. e Itoh, T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J. Dairy Sci.*, **83**, 1434-1440.
- Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A. e Imayasu, I. (1994a). Antihypertensive effects of peptide in sake and its by-products on spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 812-816.
- Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A. e Imayasu, I. (1994b). Structure and activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake less. *Biosci. Biotechnol.*, **58**, 1767-1771.

Sakai, K., Yoshino, K., Satter, M. A., Ota, F., Nii, Y., Fukuta, K., Ueda, N., Shimizu, Y. y Yamamoto, S. (2000). Effects of pH variation and NaCl on *in vitro* digestibility of cow's milk proteins in commercially available infant formulas. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **46**, 325-328.

Sánchez, L., Calvo, M. y Brock, J. (1992). Biological role of lactoferrin. *Arch. Dis. Child.*, **67**, 657-661.

Sanders, M. E. (1993). Effect of consumption of lactic cultures on human health. *Adv. Food. Nutr. Res.*, **37**, 67-130.

Sato, R., Noguchi, T. y Naito, H. (1986). Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 67-76.

Sawada, H., Furushiro, M., Hirai, K., Motoike, M., Watanabe, T. y Yokokura, T. (1990). Purification and characterization of an antihypertensive compound from *Lactobacillus casei*. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 3211-3219.

Sawyer, H. W. (1968). Heat denaturation of  $\beta$ -Lg and relevance of disulfide aggregation. *J. Dairy Sci.*, **51**, 327-329.

Schaafsma, G. (1996). Significance of probiotics in human diets. En *SOMED 21<sup>st</sup> International congress on microbial ecology and disease*, París, Octubre 28-30. París: Instituto Pasteur, p. 38.

Schaafsma, G. (1997). The western diet with a special focus on dairy products. Bruselas: Instituto Danone, p. 5.

Schlimme, E. y Meisel, H. (1995). Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Nahrung*, **39**, 1-20.



Schmidt, D. G. y Poll, J. K. (1991). Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Neth. Milk Dairy J.*, **45**, 225-240.

Schmidt, D. G. y van Markwijk, B. W. (1993). Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Influence of heat treatment of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin on their proteolysis by pepsin and papain. *Neth. Milk Dairy J.*, **47**, 15-22.

Schusdziarra, V., Schick, R., de la Fuente, A., Specht, J., Klier, M., Brantl, V. y Pfeiffer, E. F. (1983a). Effect of  $\beta$ -casomorphins and analogs on insulin release in dogs. *Endocrinology*, **112**, 885-889.

Schusdziarra, V., Schick, R., de la Fuente, A., Holland, A., Brantl, V. y Pfeiffer, E. F. (1983b). Effect of  $\beta$ -casomorphins on somatostatin release in dogs. *Endocrinology*, **112**, 1948-1951.

Sekiya, S., Kobayashi, Y., Kita, E., Imamura, Y. and Toyama, S. (1992). Antihypertensive effects of tryptic hydrolysate of casein on normotensive and hipertensive volunteers. *Journal of Japanese Society Nutrition and Food Science*, **45**, 513-517.

Shammet, K. M., Brown, R. J. y McMahon, D. J. (1992). Proteolytic activity of proteinases on macropeptide isolated from  $\kappa$ -casein. *J. Dairy Sci.*, **75**, 1380-1388.

Shebuski, R. J., Berry, D. E., Romoff, R., Storer, B. L., Ali, F. y Samanen, J. (1989). Demonstration of Ac-Arg-Gly-Asp-Ser-NH<sub>2</sub> as an antiaggregatory agent in the dog by intracoronary administration. *Thromb. Haemostasis*, **61**, 183-188.

Shiomi, M., Sakaki, K., Murofushi, M. y Aibara, K. (1982). Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, **35**, 75-80.

Skeggs, L. T., Kahan, J. E. y Sumway, N. P. (1956). The preparation and function of the angiotensin-converting enzyme. *J. Exp. Med.*, **103**, 295-299.

Smacchi, E. y Gobbetti, M. (1998). Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, **22**, 687-694.

Smacchi, E. y Gobbetti, M. (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*, **17**, 129-141.

Soffer, R. L. (1976). Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 73-94.

Spencer, E. M. y King, T. P. (1971). Isoelectric heterogeneity of bovine plasma albumin. *J. Biol. Chem.*, **246**, 201-208.

Steijns, J. (1996). Dietary proteins as the source of new health promoting bioactive peptides with special attention to glutamine peptide. *Food Tech. Europe*, **3**, 80-84.

Stepaniak, L., Fox, P. F., Sorhaug, T. y Grabska, J. (1995). Effect of peptides from the sequence 58-72 of  $\beta$ -casein on the activity of endopeptidase, aminopeptidase and x-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* MG1363. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 849-853.

Storry, J. E., Grandison, A. S., Millard, D., Owen, A. J. y Ford, G. D. (1983). Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminants. *J. Dairy Res.*, **50**, 215.

Sugai, R. (1998). ACE inhibitors and functional foods. *IDF Bulletin*, **336**, 17-20.

Svedberg, J., de Haas, J., Leimenstoll, G., Paul, F. y Teschemacher, H. (1985). Demonstration of  $\beta$ -casomorphin immunoreactive material in *in vitro* digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides*, **6**, 825-830.

- Swaisgood, H. E. (1992). Chemistry of the caseins. En *Advanced Dairy Chemistry-I, Proteins*. Fox, P. F. (ed). Elsevier Applied Science, London, p. 63-110.
- Takano, T. (1998). Milk derived peptides and hypertension reduction. *Int. Dairy J.*, **8**, 375-381.
- Takano, T., Arai, K., Murota, I., Hayakawa, K., Mizutani, T. y Mitsuoka, T. (1985). Effects of feeding sour milk on longevity and tumorigenesis in mice and rats. *Bifidobacteria Microflora*, **4**, 31.
- Tani, F., Shiota, A., Chiba, H. y Yoshikawa, M. (1994). Serorphin, an opioid peptide derived from bovine serum albumin. En  *$\beta$ -casomorphins and related peptides: recent developments*. Brantl, V. y Teschemacher, H. (eds). Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo: VCH-Verlag. pp. 49-53.
- Teschemacher, H. (1987). Casein derived opioid peptides: physiological significance? *Adv. Biosci.*, **65**, 41.
- Teschemacher, H. y Brantl, V. (1994). Milk protein derived atypical opioid peptides and related compounds with opioid antagonist activity. En  *$\beta$ -casomorphins and related peptides: recent developments*. V. Brantl and H. Teschemacher (eds). VCH, Weingheim, pp. 3-17.
- Thomas, T. D. y Pritchard, G. G. (1987). Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FEMS Microbiol. Rev.*, **46**, 245-268.
- Tirelli, A., De Noni, I. y Resmini, P. (1997). Bioactive peptides in milk products. *Ital. J. Food Sci.*, **2**, 91-98.
- Tomé, D., Dumontier, A. M., Hautefeuille, M. y Desjeux, J. F. (1987). Opiate activity and transepithelial passage of intact  $\beta$ -casomorphins in rat ileum. *Am. J. Physiol.*, **253**, G737-G744.

Tong, L. M., Sasaki, S., McClements, D. J. y Decker, E. A. (2000). Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1473-1478.

Towned, R., Weinberg, L. y Timasheff, S. N. (1960). Molecular interactions in  $\beta$ -lactoglobulin. IV. The dissociation of  $\beta$ -lactoglobulin below pH 3.5. *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3175-3179.

Umbach, M., Teschemacher, H., Praetorius, K., Hirschhäuser, R. y Bostedt, H. (1985). Demonstration of a  $\beta$ -casomorphin immunoreactive material in the plasma of newborn calves after milk intake. *Regulatory peptides*, **12**, 223-230.

Unger, T., Rockhold, R. W., Bönner, G., Rascher, W., Schaz, K., Speck, G., Schömig, A. y Ganten, D. (1981). Antihypertensive effects of the novel converting-enzyme inhibitor YS980 in spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Hypertension*, **3**, 121-140.

Urata, H., Boehm, K. D., Philip, A., Kinoshita, A., Gabrousek, J., Bumpus, F. M. y Husain, A. (1993). Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J. Clin. Invest.*, **91**, 1269-1281.

Van Willige, R. G. W. y Fitzgerald, R. J. (1995). Tryptic and chymotryptic hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin A, B and AB at ambient and high pressure. *Milchwissenschaft*, **50**, 183-186.

VanderJagt, D. J., Okolo, S. N., Costanza, A., Blackwell, W. y Glew, R. H. (2001). Antioxidant content of the milk of Nigerian women and the sera of their exclusively breast-fed infants. *Nutrition Research*, **21**, 121-128.

Walstra, P. y Jenness, R. (1984). Outline of milk composition and structure. En *Dairy Chemistry and Physics*. John Wiley and sons, (eds). New York. pp. 1-11.

Walstra, P. y Jenness, R. (1987). Proteínas. En *Química y física lactológica*. Editorial Acribia S. A., p. 84.

Whitney, R. McL. (1988). En *Proteins in milk. Fundamentals of dairy chemistry*. 3ª edición. Van Nostrand Reinhold (ed). New York.

Wolfson, L. M. y Summer, S. S. (1993). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: a review. *J. Food Protection*, **56**, 887-892.

Wong, D. W. S., Camirand, W. M. y Pavlath, A. E. (1996). Structures and functionalities of milk proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **36**, 807-844.

Wyvratt, M. J. y Patchett, A. A. (1985). Recent developments in the design of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, **5**, 485-531.

Yamamoto, N. (1997). Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopolymers*, **43**, 119-128.

Yamamoto, N. y Takano, T. (1999). Antihypertensive peptides derived from milk proteins. *Nahrung*, **43**, 159-164.

Yamamoto, N., Akino, A. y Takano, T. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.*, **77**, 917-922.

Yamamoto, N., Maeno, M. y Takano, T. (1999). Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CRN4. *J. Dairy Sci.*, **82**, 1388-1393.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. y Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **31**, 411-415.

Yano, S., Suzuki, K. y Funatsu, G. (1996). Isolation from  $\alpha$ -zein of thermolysin peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 661-663.

Yoshikawa, M. y Chiba, H. (1990). Biologically active peptides derived from milk proteins. *Japanese Journal of Dairy and Food Science*, **39**, A315-A321.

Yoshikawa, M. y Chiba, H. (1992). En *Frontiers and new horizons in amino acid research*. K. Takai (ed). Elsevier Amsterdam, pp. 403-409.

Yoshikawa, M., Tani, F. y Chiba, H. (1988). Structure-activity relationship of opioid antagonist peptides derived from milk proteins. En *Peptide Chemistry*. Shiba, T. (ed). Osaka: protein research foundation. pp. 473-476.

Yoshioka, M., Erickson, R. H., Woodley, J. F., Gulli, R., Guan, D. y Kim, Y. S. (1987). Role of rat intestinal brush border membrane angiotensin converting enzyme in dietary protein digestion. *Am. J. Physiol.*, **253**, G781-G786.

Yvon, M., van Hille, J. P., Pélissier, J. P., Guilloteau, P. y Toullec, R. (1984). In vivo milk digestion in the calf abomasum. 2. Milk and whey proteolysis. *Repr. Nutr. Develop.*, **24**, 835-843.

Zevaco, C. y Gripon, J. C. (1988). Properties and specificity of a cell-wall proteinase from *Lactobacillus helveticus*. *Le Lait*, **68**, 393-408.

Zucht, H. D., Raida, M., Andermann, K., Mägert, H. J. y Forsmann, W. G. (1995). Casocidin-I: a casein- $\alpha_{s2}$ -derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Lett.*, **372**, 185-188.