



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE QUÍMICA

INHIBIDORES DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA-I PEPTÍDICOS: OBTENCIÓN POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DE LACTOSUERO, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN

Lic. Carolina Villadóniga

Tutora: Dra. Ana María B. Cantero



Montevideo, Uruguay, 2017



Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina-I peptídicos: obtención por hidrólisis enzimática de proteínas de lactosuero, aislamiento y caracterización

Autora: Lic. Carolina Villadóniga Plada

Tesis presentada con el objetivo de obtener el título de Doctora en Química de la Facultad de Química, Universidad de la República.

Directora de Tesis: Dra. Ana María B. Cantera

Tribunal: Dra. Susana Castro, Dra. Laura Franco-Fraguas y Dra. Adriana Gámbaro

Montevideo, 28 de noviembre de 2017

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Enzimas Hidrolíticas, del Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias bajo la dirección de la Dra. Ana María B. Cantera, responsable de esta unidad y Profesora Adjunta de la Cátedra de Bioquímica, del Departamento de Biociencias de la Facultad de Química.

Agradezco a mi directora de tesis por haberme brindado la oportunidad de iniciarme en la investigación científica, por su apoyo y confianza durante todo el camino recorrido.

Agradezco a las integrantes del Tribunal las Dras: Susana Castro, Laura Franco-Fraguas y Adriana Gámbaro por su disponibilidad y apoyo.

A mis compañeros de grupo: Diego, Miriam y Shirley por el apoyo, aportes al trabajo y compañerismo demostrados permanentemente. A Laura Macció, con quien compartimos las etapas iniciales de este trabajo, por sus aportes tanto en lo científico, por su trabajo y dedicación, como en lo personal desde su optimismo, alegría y compañerismo. A Josefina y Mariana, por su compañerismo y aliento en la última etapa de este trabajo.

A mis compañeros de la Cátedra de Bioquímica de Facultad de Química, con quienes compartí mis primeros años de formación y de quienes he recibido muchas demostraciones de apoyo a lo largo del tiempo.

A la Dra. Andrea Villarino, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Facultad de Ciencias, por ayudarme con la cromatografía de afinidad, que fue fundamental para este trabajo. Así como por sugerir y facilitar el contacto con la Dra. Rosario Durán, a quién agradezco muy especialmente por realizar la identificación de los péptidos por espectrometría de masas.

A los integrantes del Instituto de Química Biológica de Facultad de Ciencias que de una u otra forma se han interesado por mi trabajo. En especial a la Dra. Beatriz Álvarez, del Laboratorio de Enzimología, por su asesoramiento en los estudios de cinética de inhibición.

Agradezco a los agentes de financiación que hicieron posible este trabajo. A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la beca de doctorado, a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por la financiación del Proyecto de Iniciación.

Agradezco a mis padres por el amor y los valores que me han transmitido, y por respaldarme incondicionalmente siempre. A mis hermanos y mi tía, por su amor y apoyo.

A Marcello, Guillermina y Felipe por su amor, apoyo, aliento y paciencia durante todo este trabajo.

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

ACN:	Acetonitrilo
ADH:	Hormona antidiurética
ALA:	Alfa-lactalbúmina
AT1:	Receptor de angiotensina II de tipo 1
BLG:	Beta-lactoglobulina
BME:	Beta-mercaptoetanol
BSA:	Albúmina sérica bovina
CEI:	Coficiente de eficiencia de inhibición
CHALA:	Concentrado de hidrolizado de ALA
CHBLG:	Concentrado de hidrolizado de BLG
CHLS:	Concentrado de hidrolizado de lactosuero
CN:	Caseína
CPA:	Carboxipeptidasa A
DH:	Grado de hidrólisis
E:	Enzima
E/S:	Relación enzima/sustrato
ECA-I:	Enzima convertidora de angiotensina-I
ECBA:	Extracto crudo de frutos maduros de <i>B. antiacantha</i>
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
E _n :	Eluido número n (n= 1, 2, 3, etc.)
EPBA:	Extracto purificado de peptidasas de frutos maduros de <i>B. antiacantha</i>
FAPGG:	N-[3-(2-furil) acriloil]-L-fenilalanilglicilglicina
FHALA:	Filtrado de hidrolizado de ALA
FHBLG:	Filtrado de hidrolizado de BLG
FHLS:	Filtrado de hidrolizado de LS
FPB:	Factor potenciador de la bradiquinina
HA:	Hipertensión arterial
HALA:	Hidrolizado de ALA
HBLG:	Hidrolizado de BLG
HHL:	Hipuril-histidil-leucina
HLS:	Hidrolizado de LS
I:	Inhibidor
IAA:	Iodoacetamida
IC ₅₀ :	Concentración inhibitoria del 50 % de la actividad
IECA-I:	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina-I
LF:	Lactoferrina
LP:	Lactoperoxidasa

LS:	Lactosuero
k_{cat} :	Constante catalítica
K_i :	Constante de inhibición
K_M :	Constante de Michaelis Menten
MALDI:	Ionización/desorción laser asistida por matriz
MS:	Espectrometría de masas
ND:	No determinado
NHS-Sepharose:	Sepharose activada con N- hidroxisuccinimida
NR:	No retenido
n :	Número de enlaces peptídicos del sustrato escindidos por acción enzimática
n_{tot} :	Número total de enlaces peptídicos del sustrato
OMS:	Organización Mundial de la Salud
OPA:	o-ftaldialdehído
PA:	Presión arterial
PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PCL:	Longitud promedio de cadena peptídica
PepBA:	Extracto parcialmente purificado de peptidasas de <i>B. antiacantha</i> .
PL:	Plasmina
RAAS:	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
RP-HPLC:	Cromatografía de alta eficiencia en fase reversa
S:	Sustrato
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
SEC:	Cromatografía de exclusión molecular
sECA-I:	Isoforma somática de ECA-I
SPE:	Extracción en fase sólida
TCA:	Ácido tricloroacético
tECA-I:	Isoforma testicular o germinal ECA-I
TFA:	Ácido trifluoroacético
TOF:	Detector de tiempo de vuelo
t_R :	Tiempo de retención
UF:	Ultrafiltración
V_{Max} :	Velocidad máxima
v_o :	Velocidad inicial
WPI:	Aislado de proteínas de LS

RESUMEN

Los inhibidores peptídicos de la enzima convertidora de angiotensina-I (ECA-I) son muy interesantes por ser compuestos naturales con efecto antihipertensivo. Muchos péptidos bioactivos han sido obtenidos por hidrólisis enzimática de proteínas alimentarias y las proteínas lácteas han tenido un papel destacado. Sin embargo, las peptidasas empleadas han sido fundamentalmente enzimas comerciales de origen animal o microbiano. El uso de peptidasas de plantas, obtenidas de fuentes menos convencionales, podría liberar nuevos péptidos inhibidores de ECA-I o aquellos que se sabe forman parte de la secuencia de las proteínas del LS pero que aún no han sido liberados con las enzimas clásicas. Las peptidasas de una especie de *Bromeliácea* autóctona, recientemente caracterizadas por nuestro grupo de investigación, presentan características interesantes para la hidrólisis del LS y aún no han sido utilizadas para la preparación *in vitro* de hidrolizados de proteínas. En este sentido, se estudió el potencial de las peptidasas de *Bromelia antiacantha* Bertol., para hidrolizar el LS y evaluar la actividad inhibidora de la ECA-I. Demostramos que las peptidasas de *B. antiacantha* fueron capaces de hidrolizar a las proteínas del LS con un importante efecto del pH de reacción para modificar la susceptibilidad de hidrólisis de α -lactalbumina (ALA) y β -lactoglobulina (BLG), las proteínas mayoritarias del LS. Se obtuvieron hidrolizados de LS, ALA y BLG con potente actividad inhibitoria de ECA-I. En todos los casos, la fracción peptídica de tamaño menor a 2 kDa presentó una actividad inhibitoria de ECA-I potente y esta fue resistente a un proceso de digestión gastrointestinal simulado *in vitro*. A partir del hidrolizado de ALA se capturaron por cromatografía de afinidad y posteriormente se identificaron por espectrofotometría de masas dos nuevos péptidos derivados de ALA con actividad inhibitoria de ECA-I. A partir de estudios de cinética de inhibición de ECA-I fue posible establecer que el péptido Thr-Thr-Phe-His-Thr-Ser-Gly-Tyr (TTFHTSGY) se comportó como un inhibidor total, mientras que el péptido Gly-Tyr-Asp-Thr-Gln-Ala-Ile-Val-Gln (GYDTQAIVQ) fue capaz de inhibir parcialmente a ECA-I y a concentraciones elevadas de inhibidor por lo que no se continuó su caracterización. Sin embargo, hay dos secuencias con actividad inhibitoria de ECA-I reportada encriptadas en el péptido GYDTQAIVQ (GY e IVQ) que podrían ser liberadas durante su digestión gastrointestinal, convirtiéndolo en productos potencialmente más activos *in vivo*. TTFHTSGY mostró una cinética de inhibición compatible con un inhibidor competitivo. Los valores de las constantes de inhibición hallados indicaron que se trataría de inhibidores reversibles competitivos clásicos.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	iii
Resumen.....	v
Tabla de Contenido	vi
Introducción	1
1. Marco Teórico.....	3
1.1 Proteínas alimentarias como fuente de ingredientes funcionales.....	4
1.1.1 Alimentos funcionales	4
1.1.2 Péptidos bioactivos.....	5
1.1.2.1 Activación proteolítica in vivo de péptidos bioactivos.....	7
1.1.2.2 Activación proteolítica in vitro de péptidos bioactivos.....	7
1.2 Hipertensión arterial	9
1.2.1 Mecanismos de control de la presión arterial	9
1.2.1.1 Sistema renina-angiotensina-aldosterona	9
1.2.1.2 Enzima convertidora de angiotensina I.....	10
1.2.2 Inhibidores de ECA-I sintéticos	12
1.2.3 Inhibidores de ECA-I derivados de proteínas alimentarias	13
1.2.3.1 Péptidos IECA-I obtenidos por hidrólisis enzimática de proteínas lácteas	14
1.2.3.2 Relación estructura función de los péptidos IECA-I.....	15
1.2.3.3 Actividad in vivo de los péptidos IECA-I	15
1.3 Lactosuero.....	17
1.3.1 Proteínas del LS.....	17
1.3.2 β -Lactoglobulina	18
1.3.2.1 Estructura molecular.....	18
1.3.2.2 Transición de Tanford	20
1.3.2.3 Reacciones de asociación y disociación	21
1.3.2.4 Efecto de la temperatura en la estructura nativa	22
1.3.3 α -Lactalbúmina	22
1.3.3.1 Estructura molecular.....	23
2 Hipótesis de trabajo y Objetivos	26
2.1 Hipótesis de trabajo	27
2.2 Objetivo general.....	27
2.3 Objetivos específicos.....	27

3	Materiales y métodos.....	28
3.1	Hidrólisis de proteínas de LS con PepBA.....	29
3.1.1	Materiales.....	29
3.1.2	Preparación del extracto crudo de <i>B. antiacantha</i>	29
3.1.3	Preparación del extracto parcialmente purificado de <i>B. antiacantha</i>	29
3.1.4	Actividad proteolítica.....	29
3.1.5	Cuantificación de proteínas.....	30
3.1.6	Hidrólisis enzimática de las proteínas del lactosuero con PepBA.....	30
3.1.7	Grado de Hidrólisis.....	30
3.1.8	Hidrólisis total.....	30
3.1.9	Determinación de grupos aminos primarios.....	31
3.1.10	Susceptibilidad y mecanismo de hidrólisis de ALA y BLG en función de las condiciones de reacción.....	31
3.1.10.1	Tricina-SDS PAGE.....	31
3.1.10.2	Cinética de la proteólisis.....	32
3.2	Caracterización de los hidrolizados de proteínas de LS.....	33
3.2.1	Preparación de hidrolizados de LS, ALA y BLG.....	33
3.2.2	Concentración peptídica de las fracciones de hidrolizados.....	33
3.2.3	Actividad inhibidora de ECA-I.....	33
3.2.4	Determinación del IC ₅₀	34
3.2.5	Perfil peptídico.....	34
3.2.6	Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	34
3.3	Purificación de péptidos IECA.....	35
3.3.1	Cromatografía de exclusión molecular.....	35
3.3.1.1	SEC en Sephadex G-25.....	35
3.3.1.2	SEC-HPLC.....	35
3.3.2	Extracción en fase sólida del hidrolizado de lactosuero.....	36
3.3.3	Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC).....	36
3.4	Purificación, identificación y caracterización de péptidos IECA derivados de ALA.....	38
3.4.1	Purificación de las peptidasas del extracto crudo de <i>B. antiacantha</i>	38
3.4.2	Hidrólisis de ALA.....	38
3.4.3	Inmovilización de ECA-I en NHS-Sepharose 4 Fast Flow.....	38
3.4.4	Purificación de los péptidos IECA por cromatografía de afinidad.....	39

3.4.5	Identificación y secuencia de péptidos IECA	39
3.4.6	Síntesis de péptidos inhibidores de ECA-I	39
3.4.7	Análisis de los perfiles de RP-HPLC de los péptidos sintéticos	40
3.4.8	Caracterización estructural de los péptidos IECA-I identificados	40
3.4.9	Caracterización cinética de los péptidos IECA-I identificados	40
4	Resultados y Discusión	42
4.1	Hidrólisis de proteínas de LS con PepBA	43
4.1.1	Efecto de las condiciones de reacción en la hidrólisis del LS	43
4.1.1.1	Efecto de la relación enzima/sustrato	43
4.1.1.2	Efecto de la temperatura	45
4.1.1.3	Efecto del pH	47
4.1.2	Efecto del pH y la temperatura en la susceptibilidad a la hidrólisis de las proteínas del LS	49
4.1.2.1	Efecto del pH en la hidrólisis de ALA y BLG	49
4.1.2.2	Efecto de la temperatura en la hidrólisis de ALA y BLG	55
4.1.3	Cinética de degradación de ALA y BLG aisladas	57
4.1.3.1	Degradación de ALA	57
4.1.3.2	Degradación de BLG	59
4.2	Caracterización de los hidrolizados de proteínas de LS	62
4.2.1	Grado de hidrólisis	62
4.2.2	Evaluación de la actividad IECA-I <i>in vitro</i>	64
4.2.2.1	Evolución de la actividad IECA-I en función del tiempo de hidrólisis	64
4.2.2.2	Coeficiente de eficiencia de inhibición	66
4.2.3	Relación dosis-respuesta de las fracciones con actividad IECA-I	68
4.2.4	Caracterización de los perfiles peptídicos	71
4.2.5	Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de fracciones peptídicas con actividad IECA-I	75
4.3	Evaluación de diferentes estrategias para la separación de péptidos IECA-I de hidrolizados de proteínas de LS	77
4.3.1	Cromatografía de exclusión molecular	77
4.3.1.1	Purificación de péptidos IECA-I a partir de HLS	77
4.3.1.2	Purificación de péptidos IECA-I a partir de hidrolizado de ALA y BLG aisladas	87
4.3.2	Extracción en fase sólida	90
4.3.3	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP HPLC)	92
4.3.3.1	Purificación de péptidos IECA-I a partir de HLS	92

4.3.3.2 Purificación de péptidos IECA-I a partir de hidrolizados de ALA y BLG aisladas	94
4.4 Purificación por cromatografía de afinidad de péptidos IECA-I a partir de hidrolizados de ALA	99
4.4.1 Purificación de las peptidasas del extracto crudo de frutos de <i>B antiacantha</i> (ECBA)	99
4.4.2 Hidrólisis de ALA con EPBA	100
4.4.3 Purificación por cromatografía de afinidad	100
4.4.4 Identificación de secuencias de péptidos IECA-I	101
4.4.5 Actividad IECA-I de los péptidos sintetizados	103
4.4.6 Perfil de RP-HPLC de los péptidos sintéticos	105
4.4.7 Caracterización estructural de los péptidos IECA-I identificados	106
4.4.8 Caracterización cinética de los péptidos IECA-I identificados	107
Conclusiones	113
Referencias	115
Apéndice 1	125
Gráficos de Michaelis y Menten para la degradación de ALA y BLG con PepBA y papaína	125
Apéndice 2	130
Calibración de columna Superdex Peptide 10/300 GL con estándares de masa molecular	130
Apéndice 3	131
Digestión gastrointestinal simulada del péptido GYDTQAIVQ	131
Apéndice 4	132
Cálculo de la constante de inhibición de los péptidos TTFHTSGY y DKVGINYWLAH a partir de gráficos de v_0 en función de concentración de inhibidor [I]	132
Apéndice 5	133
Cálculo de la constante de inhibición de los péptidos TTFHTSGY y DKVGINYWLAH a partir de gráficos de Cornish Bowden	133
Anexo 1	134
Espectros de masas (MALDI-TOF/TOF) de fracciones del HLS separadas por SEC en columna Sephadex G-25 (pooles A, B, D y H)	134
Anexo 2	136
Informe de identificación de secuencias de péptidos derivados de ALA purificados por cromatografía de afinidad	136
Anexo 3	140
Reporte del análisis de los péptidos sintéticos	140

Anexo 4..... 149

Valores de IC₅₀ y secuencias de péptidos inhibidores de ECA-I derivados de ALA depositados en BIOPEP 149

INTRODUCCIÓN

En este trabajo se hidrolizaron las proteínas de lactosuero (LS) de forma de generar péptidos con potencial inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I). Se evaluaron las condiciones óptimas de reacción de hidrólisis. Los péptidos, con actividad IECA-I, obtenidos fueron identificados y caracterizados.

La leche es muy valorada por sus cualidades nutricionales, pero actualmente también lo es por ser fuente de diversos péptidos bioactivos. La industria láctea nacional, genera grandes volúmenes de LS que son parcialmente aprovechados para la producción de LS en polvo, un producto de bajo valor agregado, y el excedente es descartado con el consiguiente efecto negativo para el medioambiente. El uso de LS para la producción de péptidos bioactivos transformaría un co-producto poco valorado en un producto de alto valor agregado.

Los péptidos con actividad antihipertensiva son de especial relevancia pues constituyen una alternativa no farmacológica para la prevención y el control de la hipertensión arterial, una de las principales causas mundiales de muerte. Se han identificado muchos péptidos derivados de proteínas alimentarias capaces de reducir la presión arterial.

Los inhibidores de la ECA-I son empleados en la clínica como fármacos para tratar la hipertensión. En la búsqueda de péptidos antihipertensivos se han considerado fundamentalmente los péptidos capaces de inhibir a la ECA-I *in vitro* para luego evaluar su actividad antihipertensiva *in vivo*.

La estrategia más empleada para producir péptidos inhibidores de ECA-I (IECA), a partir de productos naturales, es la hidrólisis enzimática. Fundamentalmente, se han empleado enzimas digestivas animales como pepsina, tripsina y quimotripsina, o de origen microbiano, mientras que las enzimas vegetales han sido muy poco empleadas.

A pesar de haberse producido muchos péptidos IECA a partir de las proteínas mayoritarias del LS no se han liberado todas las secuencias bioactivas potenciales. Existen péptidos sintéticos, con actividad IECA-I demostrada, cuyas secuencias forman parte de la secuencia de las proteínas del LS que no han sido identificadas en hidrolizados enzimáticos de LS. El péptido LF correspondiente al fragmento f 52-53 de ALA y f 104-105 de BLG (Tavares & Malcata, 2013) es un ejemplo. En otros casos, existen péptidos IECA-I que fueron producidos a partir de otros sustratos proteicos pero que su secuencia también forma parte de la de las proteínas del LS, como el péptido LIVTQ identificado en un producto fermentado de proteínas de soja que corresponde al fragmento f17-21 de la secuencia de BLG (Vallabha & Tiku, 2013).

Es evidente que la composición peptídica de los hidrolizados, de un sustrato particular, depende fuertemente de la especificidad de la peptidasa empleada. El uso de peptidasas obtenidas de fuentes menos convencionales, que puedan clivar las proteínas sustrato en sitios diferentes, podrían liberar nuevos péptidos IECA o aquellos que se sabe forman parte de la secuencia de las

proteínas del LS pero que aún no han sido liberados con las enzimas clásicas. Las peptidasas de flores de cardo (*Cynara cardunculus*) fueron utilizadas para hidrolizar concentrados de proteína de LS bovino, liberando péptidos inhibidores de la ECA muy potentes (Tavares & Malcata, 2013). Se liberaron secuencias activas a partir de las proteínas mayoritarias del LS que son diferentes a los obtenidos por digestión enzimática de estos sustratos con otras peptidasas reportados anteriormente. También se registró actividad IECA en hidrolizados de proteína de LS con extractos acuosos de flores de *Arctium minus* (Cimino, Colombo, Liggieri, Bruno, & Vairo-Cavalli, 2015) y en hidrolizados de LS con peptidasas de frutos de *Maclura pomifera* (Bertucci, Liggieri, Colombo, Vairo Cavalli, & Bruno, 2015).

Bromelia antiacantha es una especie nativa de Uruguay y Brasil con distribución endémica en la mata atlántica. Los frutos de esta especie son conocidos popularmente como «banana do mato» o «gravatá» y han sido utilizados en medicina popular para el tratamiento de la tos y como emoliente. Según estudios realizados en Brasil, la extracción sustentable de estos frutos en poblaciones naturales es una actividad económicamente interesante. Los frutos maduros de *B antiacantha* presentan una concentración inusualmente alta de peptidasas. Estas enzimas están siendo caracterizadas en nuestro grupo de investigación (Vallés, Furtado, & Cantera, 2007) y presentan características que las hacen candidatos muy buenos para la hidrólisis de proteínas de LS. El extracto crudo de estos frutos es estable en amplio rango de pH y temperatura, lo que aporta flexibilidad para seleccionar las condiciones de reacción más convenientes. Puede consumirse sin consecuencias para la salud mayores a la irritación perioral atribuida a la alta concentración de oxalato de calcio y enzimas proteolíticas. Presenta propiedades organolépticas agradables (sabor muy dulce y ácido, aroma cítrico). Esto es importante desde los puntos de vista bromatológico y sensorial, si se piensa que el hidrolizado de LS en última instancia debería ser consumido para llevar adelante su efecto fisiológico. Las enzimas presentan una especificidad primaria de corte semejante a la de la papaína, una enzima ampliamente caracterizada con la que se pueden comparar los resultados obtenidos.

Los antecedentes exitosos de peptidasas no clásicas junto con las características promisorias que presentan las peptidasas de *Bromelia antiacantha* Bertol. son los fundamentos en los que basamos nuestra hipótesis de generar nuevos péptidos IECA a partir de las proteínas de LS.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Proteínas alimentarias como fuente de ingredientes funcionales

El rol básico de los alimentos es el de aportar energía para el funcionamiento y crecimiento del cuerpo. Los aspectos de los alimentos más valorados por nutricionistas y consumidores han sido el valor nutricional y la búsqueda de nuevos nutrientes, las propiedades sensoriales, y la identificación de componentes con impacto negativo en la salud al ser consumidos en la cantidad necesaria.

Actualmente, en la valoración de los alimentos además son muy importantes los aspectos relacionados con su impacto en la salud, es decir su capacidad de modular los sistemas fisiológicos para asegurar el bienestar y la salud, minimizando el riesgo de padecer enfermedades (nutrición óptima). Se han identificado muchos componentes en los alimentos con propiedades beneficiosas para la salud y en algunos casos su efectividad fue demostrada. Existe interés y se está investigando para entender cómo actúan estos componentes de los alimentos a nivel molecular. La meta es desarrollar, mediante diseño racional, estrategias capaces de manipular las funciones celulares a través de la dieta. Para lograrlo se deben identificar los genes, proteínas y metabolitos que presenten una expresión diferencial en respuesta a estos componentes de los alimentos. Estos estudios implican abordajes de transcriptómica (análisis de la expresión de genes), proteómica (análisis de la expresión de proteínas) y metabolómica (perfil metabólico). La alimentómica (foodomics en inglés) es la disciplina que aplica las tecnologías «ómicas» para el estudio de los alimentos en este sentido (Valdés, Cifuentes, & León, 2017).

1.1.1 Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son alimentos con funciones para mejorar la salud y el bienestar, y reducir el riesgo o retrasar la aparición de las enfermedades más importantes. El concepto de alimento funcional surgió en Japón en los años 80 como una medida para mejorar la calidad de vida, debido al impacto económico que había generado el envejecimiento de la población dada la mayor esperanza de vida.

Se reconoce ampliamente que, un alimento para ser funcional debe aportar un beneficio para la salud, ser o asemejarse a un alimento, tener una función más allá de la nutricional y consumirse en una dieta normal. Para que un alimento se considere funcional deben existir evidencias de los beneficios que brinda para la salud y los mecanismos y exigencias (tipo de pruebas) para lograr este rótulo dependen de la legislación del país o región.

Un alimento funcional debe tener un efecto fisiológico y un grado de intensidad funcional que supere el nivel mínimo. El límite inferior es la reducción del riesgo de enfermedad. No se considera un alimento funcional a aquel que únicamente mejora el equilibrio nutricional, como es el caso de un alimento enriquecido o mejorado. Si un alimento, o componente del mismo, fuese capaz de curar una enfermedad (efecto fisiológico máximo) tampoco debería considerarse un alimento funcional sino una droga o medicamento. Los alimentos funcionales no curan, el

límite superior de su efecto fisiológico es contribuir a recuperar la salud (Doyon & Labrecque, 2008).

Una definición propuesta por Doyon y Labrecque (2008) generada a partir de una extensa revisión bibliográfica es la siguiente:

Un alimento funcional es, o se asemeja a, un alimento convencional. Forma parte de una dieta estándar y se consume en una base regular, en cantidades normales. Tiene efectos en la salud comprobados que reducen el riesgo de enfermedades crónicas específicas o afecta beneficiosamente determinadas funciones más allá de sus funciones nutricionales básicas¹

De esta manera han surgido en el mercado alimentos con elevado contenido de diferentes componentes bioactivos como por ejemplo: ácidos grasos o esteroides, péptidos bioactivos, antioxidantes, carbohidratos prebióticos, vitaminas o minerales, y bacterias prebióticas (Juárez, 2010).

1.1.2 Péptidos bioactivos

Las proteínas, son reservorio de péptidos que regulan los procesos vitales de los organismos (Karelín, Blishchenko, & Ivanov, 1998). Por lo tanto, actualmente también son consideradas como fuente de péptidos bioactivos. Esto amplía el criterio para calificar el valor de las proteínas, que por mucho tiempo se ha limitado a su calidad nutricional evaluada por la disponibilidad de nitrógeno (aminoácidos esenciales y no esenciales), las propiedades alergénicas y la ausencia de anti-nutrientes (Dziuba & Darewicz, 2007).

Los péptidos bioactivos son productos de la degradación de proteínas, que adquieren una función biológica específica solo luego de ser liberados de la proteína precursora. Estos péptidos inducen una respuesta fisiológica al interactuar con los receptores específicos de sus células blanco. La actividad biológica puede tener efecto positivo o negativo en el organismo. Los péptidos tóxicos del gluten, responsables de la enfermedad celíaca, son un ejemplo de péptidos con efectos negativos en el organismo (Kitts & Weiler, 2003).

Se ha demostrado que existen péptidos bioactivos capaces de causar efectos fisiológicos beneficiosos en el sistema inmune, cardiovascular, endócrino y digestivo. Dentro de las actividades que han sido estudiadas se destacan las siguientes: antihipertensiva, antimicrobiana, antioxidante, opioide, antitumoral, inmunomoduladora, transportadora de calcio, antitrombótica, hipocolesterolémica y antioxidante.

Muchos de los péptidos bioactivos que se han reportado se encuentran depositados en la base de datos BIOPEP (URL: www.uwm.edu.pl/biochemia), desarrollada en la Cátedra de Bioquímica de Alimentos de la Uniwersytet Warmińsko Mazurski (Olsztyn, Polonia; Minkiewicz, Dziuba, Iwaniak, Dziuba, & Darewicz, 2008). Actualmente se encuentran depositados 3491 péptidos con

¹ Traducción del autor de (Doyon, M. y Labrecque, J.A., 2008, p. 1144)

diferentes actividades derivados de distintas proteínas. Las actividades que presentan mayor cantidad de péptidos depositados en BIOPEP corresponden a los inhibidores de ECA-I, antioxidantes, antibacterianos e inhibidores de peptidil peptidasa IV (FIGURA 1). Esto resalta el interés que presentan estas bioactividades debido probablemente a que están relacionadas con patologías relevantes como la salud cardiovascular, infecciones y diabetes tipo-2.

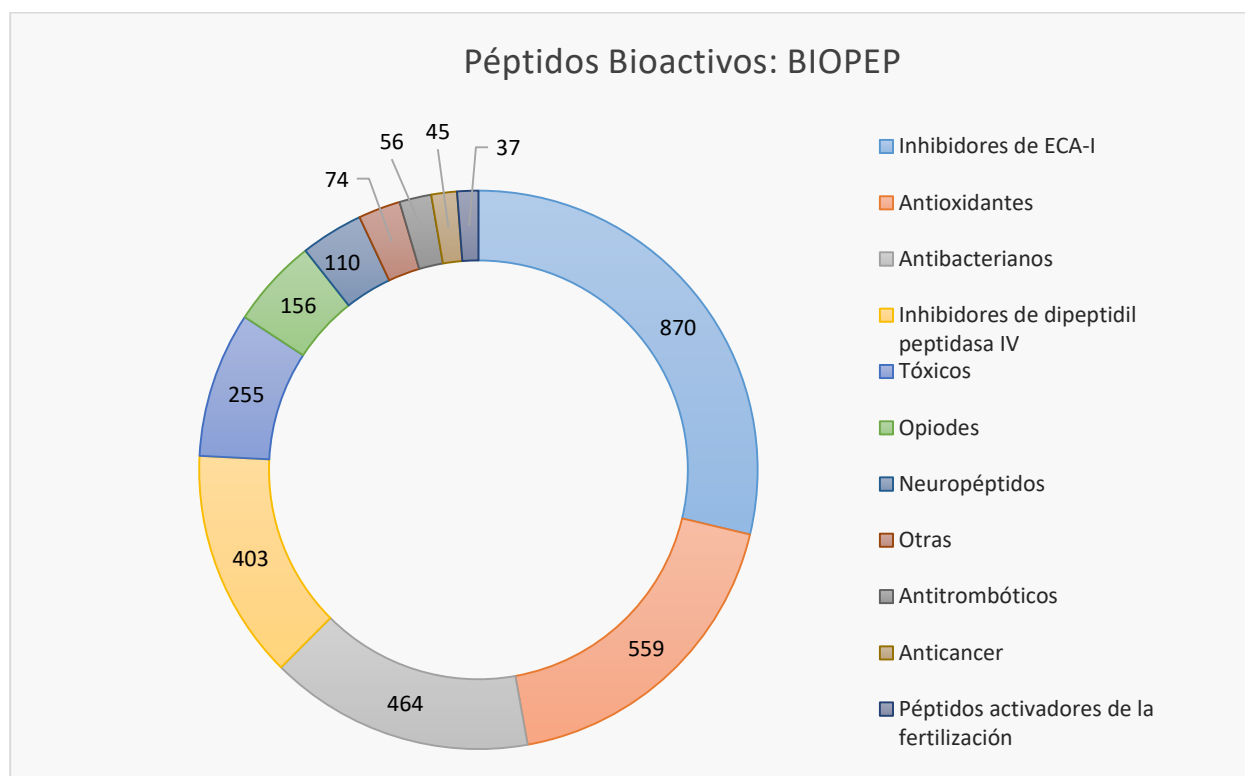


FIGURA 1. Péptidos bioactivos depositados en BIOPEP clasificados según el tipo de bioactividad. Los valores que figuran en el gráfico corresponden a la cantidad de péptidos para cada actividad biológica.

Dentro de los péptidos bioactivos existe una gran diversidad. El tamaño generalmente es de entre dos a 20 residuos de aminoácido (Pihlanto Leppälä, 2000). Se han identificado di o tri péptidos, así como polipéptidos complejos, lineales, o cíclicos glicosilados, fosforilados o acilados (Dziuba & Darewicz, 2007).

Un péptido puede poseer más de una función biológica (péptido multifuncional) o pueden existir secuencias peptídicas solapadas con diferentes funciones, como en las caseínas (Meisel, 2004).

Los péptidos bioactivos pueden ejercer su acción tanto a nivel local (por interacción con receptores de la mucosa gastrointestinal) así como a nivel sistémico, ya que son capaces de atravesar el epitelio intestinal (Meisel, 2004; Vermeirssen, Van Camp, & Verstraete, 2004). Los dipéptidos o tripéptidos pueden ser absorbidos más fácilmente que los péptidos de mayor tamaño. Se ha observado que los péptidos que actúan a nivel local, como los péptidos antimicrobianos, son más largos. Si bien la relación estructura-actividad de muchos péptidos

bioactivos aún no ha sido plenamente establecida se han observado características estructurales comunes para una determinada bioactividad.

1.1.2.1 Activación proteolítica *in vivo* de péptidos bioactivos

Las proteínas son precursores potenciales de péptidos bioactivos tanto como compuestos endógenos de los organismos vivos así como exógenos de origen alimenticio.

La liberación de péptidos bioactivos por proteólisis ha sido demostrada tanto *in vivo* como *in vitro*. Se conoce un gran número de péptidos bioactivos que fueron aislados de fluidos corporales y tejidos de diferentes organismos (bacterias, hongos, plantas y animales). Entre estos se encontraron péptidos derivados tanto de proteínas especializadas (precursores de hormonas, neurotransmisores) como de proteínas con otras funciones (enzimas, proteínas estructurales, de transporte, etc.). Se postula que estos péptidos podrían tener un rol de regulación a largo plazo, en balance homeostático del organismo (Karelin et al., 1998; Ivanov, Karelin, Blischenko, Philippova, & Nazimov, 1998). Otra fuente endógena de péptidos bioactivos son las proteínas de la dieta que pueden generar estos péptidos durante la digestión gastrointestinal (Egger & Ménard, 2017). Por ejemplo, se reportó la presencia de péptidos opioides y antihipertensivos en digestos gastrointestinales tras el consumo de caseína (Boutrou et al., 2013). La evidencia de la liberación de péptidos bioactivos por digestión de proteínas *in vitro* es basta y se describe a continuación.

1.1.2.2 Activación proteolítica *in vitro* de péptidos bioactivos

La hidrólisis enzimática de las moléculas de proteína enteras ha sido la forma más común de producir péptidos bioactivos (Korhonen & Pihlanto, 2006). Se han obtenido péptidos bioactivos por degradación enzimática *in vitro* tanto de homogenatos de tejidos como de proteínas individuales. Entre otros, se encontraron fragmentos bioactivos derivados de β -caseína (β -casomorfina), hemoglobina (hemorfina), gluten, seralbúmina bovina, citocromo c, ovoalbúmina, lactoferrina, proteínas de soja (Yoshikawa, 2015). Las proteínas alimentarias representan una fuente muy importante de péptidos bioactivos que pueden ser liberados por degradación proteolítica *in vitro* (Rutherford-Markwick & Moughan, 2005).

Las enzimas pancreáticas, principalmente tripsina, han sido muy utilizadas para liberar péptidos bioactivos de las proteínas de la dieta. Otras enzimas y combinaciones de estas incluyendo alcalasa, quimotripsina, pancreatina y pepsina, así como de fuentes bacterianas y fúngicas, han sido aplicadas para generar péptidos bioactivos a partir de varias fuentes proteicas (Korhonen & Pihlanto Leppala, 2003). Las peptidasas vegetales han sido menos empleadas para estos fines.

Así mismo, se detectaron péptidos bioactivos producidos durante el procesamiento de algunos alimentos (quesos y sueros de quesería) o por acción de enzimas proteolíticas nativas (leche) o enzimas bacterianas usadas en la preparación del alimento, como en el caso de las leches fermentadas (Korhonen & Pihlanto Leppala, 2003).

También se han obtenido péptidos modificados por semisíntesis, diseñados a partir de péptidos naturales, con el fin de incrementar su actividad (Teschemacher, Koch, & Brantl, 1997).

1.2 Hipertensión arterial

La hipertensión arterial (HA) constituye la principal causa de muerte en el planeta. Los datos de la OMS (Organización Mundial de la Salud) más recientes le atribuyen 9,4 millones de muertes en un total de 51 millones (WHO, 2013). En nuestro país, un 33% de la población adulta presenta HA y 27 % de estos hipertensos no lleva un control adecuado de su presión arterial (PA; Sociedad Uruguaya de Hipertensión Arterial, 2005). El riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares está directamente relacionado con el nivel de presión sanguínea. Por cada 5 mm Hg de reducción en la presión diastólica hay una reducción del 16 % del riesgo de estas enfermedades (FitzGerald, Murray, & Walsh, 2004). Las estrategias utilizadas para el tratamiento y la prevención de las enfermedades cardiovasculares se centran en el control de los factores de riesgo subyacentes, siendo el control de la PA un factor clave.

1.2.1 Mecanismos de control de la presión arterial

El control de la PA está regulado por diversos sistemas que interactúan. El sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) es el principal regulador de la PA. Sin embargo, existen otros sistemas independientes del RAAS que generan moléculas vaso reguladoras, como el sistema quinina-óxido nítrico, el sistema de la enzima convertidora de angiotensina II y el sistema de la enzima convertidora de endotelina (Leckie, 2005). Estos sistemas generan una variedad de péptidos reguladores, que a través de receptores de membrana de diferentes tejidos del organismo, modulan la PA y los balances de líquidos y electrolitos.

1.2.1.1 Sistema renina-angiotensina-aldosterona

El mecanismo de control de la PA ejercido por el sistema RAAS es el más conocido y juega un rol crucial en este sentido. La activación del sistema RAAS, comienza con la secreción de renina en el riñón y finaliza con la producción de angiotensina II (FIGURA 2). En respuesta a una señal de hipovolemia o disminución del flujo sanguíneo (como en una hemorragia) la glicoproteína angiotensinógeno, producida en el hígado, es liberada a la circulación y clivada por la renina, una proteasa aspártica que se encuentra en las células yuxtglomerulares del riñón, para formar el decapeptido angiotensina I. La angiotensina I es clivada a su vez por la enzima convertidora de angiotensina-I (ECA-I) generándose dos fragmentos, de los cuales, el octapéptido denominado angiotensina II presenta efecto vasoconstrictor. ECA-I es una metalopeptidasa ubicua presente en la superficie de las células endoteliales, que se expresa en altas concentraciones en el endotelio pulmonar. La unión de angiotensina II a los receptores de tipo 1 (AT1) de las células de músculo liso de los vasos sanguíneos, estimula la producción de inositol trifosfato intracelular. Esto a su vez, provoca la salida de calcio y activa la contracción muscular que desencadena el efecto vasoconstrictor. La angiotensina II también estimula la secreción de la hormona antidiurética (ADH), que a su vez, aumenta la reabsorción de agua y la secreción de aldosterona. Esta última aumenta la reabsorción renal de sodio y la excreción de potasio y protones. La acumulación de agua incrementa el volumen extracelular incrementando la PA y en consecuencia la reducción de la producción de renina. La ECA-I además actúa sobre el sistema quinina-

calicreína, catalizando la degradación de las bradiquininas, compuestos de potente acción vasodilatadora, que también favorece el incremento de la PA.

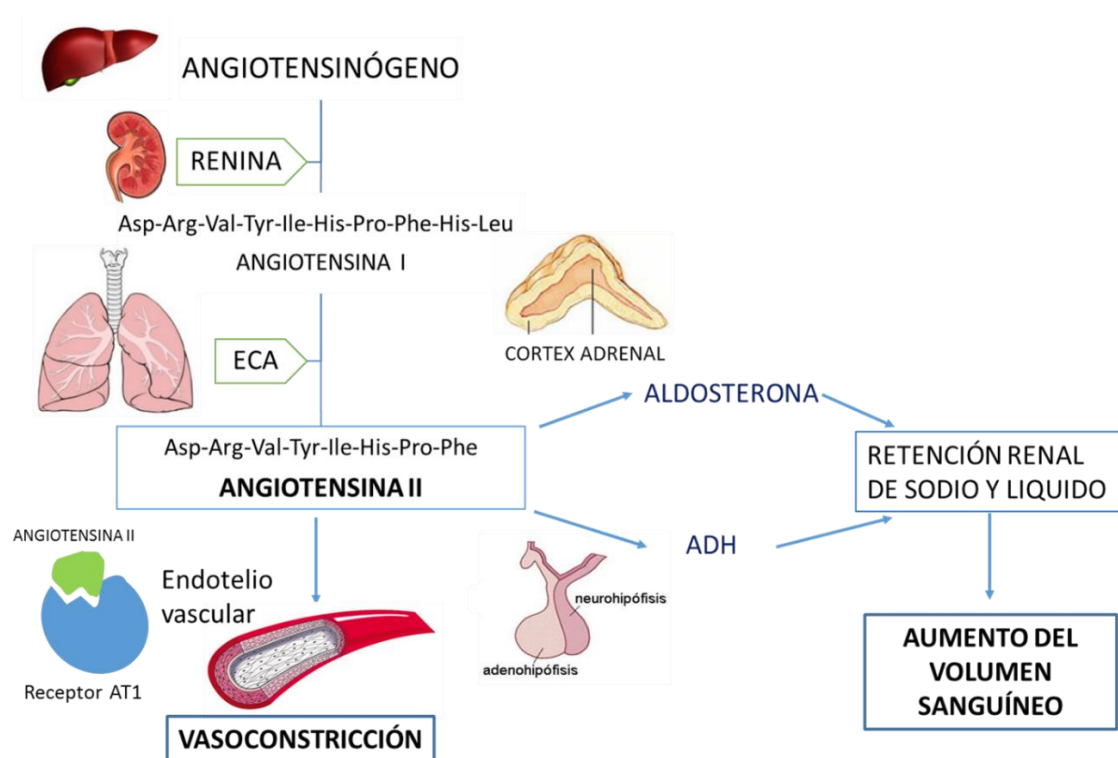


FIGURA 2. Sistema renina angiotensina aldosterona. ADH: hormona antidiurética

En la clínica médica, el control de la PA es abordado desde dos estrategias principales, la promoción de estilos de vida saludables y los tratamientos farmacológicos. Se recomiendan dietas con mayor consumo de frutas, vegetales y lácteos reducidos en grasas; la reducción del consumo de sodio; el consumo moderado de alcohol y la eliminación del hábito de fumar así como combatir el sedentarismo. Para llevar adelante la terapia antihipertensiva se disponen de diferentes grupos de drogas. En la clínica se usan: diuréticos, inhibidores de ECA-I (IECA-I), antagonistas de angiotensina II (bloqueadores de los receptores AT₁), betabloqueantes y antagonistas de calcio (Waeber, Brunner, Burnier, & Cohn, 2007).

1.2.1.2 Enzima convertidora de angiotensina I

La ECA-I es una metalopeptidasa dependiente de Zn²⁺ ya que este ion es esencial para su actividad catalítica. Pertenece a la familia M2 del subclan MA(E) de las metalopeptidasas de zinc (Sturrock, Anthony, & Danilov, 2013). De acuerdo a su especificidad primaria es una peptidil dipeptidasa debido a que cliva el dipéptido C-terminal de oligopéptidos con el extremo C-terminal libre y que no tengan Pro como penúltimo residuo. Además de los sustratos angiotensina II y bradiquinina ya mencionados (1.2.1.1), esta enzima posee una amplia especificidad de sustrato. Su capacidad de clivar péptidos con diferente actividad biológica hace que ECA-I esté implicada en muchos

procesos fisiológicos, además de la regulación de la PA (Sturrock, Natesh, van Rooyen, & Acharya, 2004).

Se han descrito dos isoformas de esta enzima en tejidos de mamíferos, que fueron denominadas ECA-I somática (sECA-I) y ECA-I testicular o germinal (tECA-I), con masas moleculares de 150-180 kDa y 90-110 kDa respectivamente (Menard & Patchett, 2001). sECA-I presenta dos dominios catalíticos homólogos llamados dominio N y dominio C (FIGURA 3). Su distribución incluye el endotelio vascular (con alta expresión en los pulmones), el riñón, el sistema nervioso central, los enterocitos y las células mononucleares circulantes. tECA-I constituye la porción C-terminal de sECA-I con una región N-terminal corta o-glicosilada (FIGURA 3) y su distribución es exclusivamente testicular. Ambas isoformas presentan un péptido señal, de 29 residuos responsable del anclaje en la membrana plasmática. También se ha detectado una forma soluble de las isoformas que se encuentra presente en los fluidos biológicos (Sturrock et al., 2013).

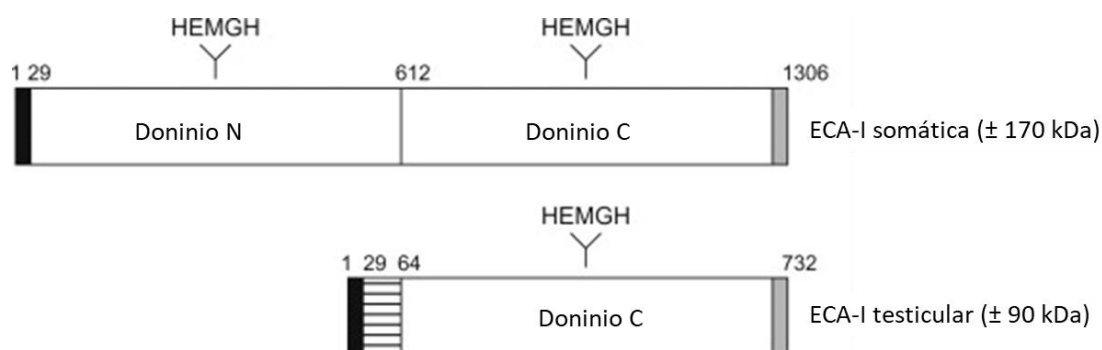


FIGURA 3. Esquema de la estructura de las formas somática y testicular de ECA-I humana. La forma somática presenta dos dominios homólogos (dominios N y C) mientras que la forma testicular solo presenta el dominio C de la forma somática, unido a una región N terminal de 67 residuos. Ambos dominios presentan un sitio activo funcional con la secuencia consenso de sitios de unión al zinc HEXXH y un péptido señal corto en el extremo C terminal que sirve de anclaje en la membrana. Adaptado de (Sturrock et al., 2013).

Ambos dominios contienen la secuencia HEMGH, un motivo muy conservado del sitio activo de las metalopeptidasas de zinc. Las dos His de este motivo junto con un residuo de glutamato localizado hacia el extremo C-terminal, coordinan el átomo de zinc esencial para la catálisis. La hidrólisis del sustrato esta activada por la presencia de ion cloruro dependiendo del sustrato. El dominio C, que tiene dos sitios de unión a cloruro, es fuertemente activado por ion cloruro mientras que el dominio N, que solo presenta un de estos sitios, no presenta este tipo de activación (Natesh, Schwager, Sturrock, & Acharya, 2003). Ambos dominios tienen tres puentes disulfuro y un cisteína libre. Se ha determinado que tanto el dominio C como el N están fuertemente glicosilados. El dominio C presenta 10 sitios potenciales de N-glicosilación, mientras que el dominio N presenta solo siete de estos sitios. importantes para la actividad y estabilidad de la ECA-I (Anthony et al., 2010).

Ambos dominios son capaces de hidrolizar angiotensina I y bradiquinina *in vitro*, pero se ha demostrado que el dominio C es el sitio de clivaje principal de angiotensina I *in vivo* y el por lo tanto el encargado de la regulación de la PA. El dominio N cliva preferencialmente angiotensina

1-7, la hormona liberadora de gonadotropina y el péptido acetil-seril-aspartil-lisil-prolina contribuyendo a la regulación de la diferenciación y proliferación de las células madre hematopoyéticas (Akif et al., 2011).

1.2.2 Inhibidores de ECA-I sintéticos

Los inhibidores de la ECA-I son fármacos de primera línea para el control de la hipertensión en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares (Ibrahim, 2006). La ECA-I regula el balance entre las propiedades vasoconstrictoras y de retención de sal de la angiotensina II y las propiedades vasodilatadoras de la bradiquinina. Al inhibirse esta enzima se produce una disminución de la formación de angiotensina II y de la degradación de bradiquinina y el consecuente descenso de la PA.

A pesar de su amplio uso como agentes terapéuticos, dada su probada eficacia, los inhibidores de la ECA-I sintéticos comerciales, presentan efectos colaterales. Los efectos no deseados como la tos seca, angioedema y disgeusia probablemente están relacionados con la acumulación de bradiquinina (Akif et al., 2011). Debido a esto, la modificación de estas drogas o el desarrollo nuevas con menos efectos colaterales es un área de investigación abierta (Kamath, Rajini, Lohith, Somashekar, & Divakar, 2006).

Los primeros inhibidores exógenos de la ECA-I surgieron a partir del hallazgo de que los extractos alcohólicos del veneno de la serpiente brasilera yarará (*Bothrops jararaca*) producían un efecto potenciador de la contracción del músculo liso no vascular, hipotensión y aumento de la permeabilidad capilar. Se estableció que estos efectos del extracto, llamado inicialmente *factor potenciador de bradiquinina* (FPB o BPF en inglés), derivaban de la potenciación de la actividad de la bradiquinina y de la inhibición de la ECA-I. A pesar de demostrarse su actividad antihipertensiva, se constató la falta de actividad oral, atribuible a su naturaleza peptídica, lo que impidió su uso terapéutico (Cushman & Ondetti, 1999).

Cushman y Ondetti propusieron un modelo de la estructura de ECA-I basados en su homología con la carboxipeptidasa A (CPA). El modelo asumía que ECA-I es una metalopeptidasa dependiente de Zn^{2+} con un sitio activo parecido al de la CPA. A partir de este modelo se iniciaron los trabajos de diseño racional de inhibidores. Los estudios de relación estructura-actividad de estos péptidos indicaron que la secuencia carboxi-terminal óptima para unirse al sitio activo de la ECA-I era Phe-Ala-Pro, tanto para inhibidores como para sustratos. Las cadenas laterales de estos tres residuos interactúan específicamente con los subsitios, o bolsillos, del sitio activo de la ECA-I, llamados S_1 , S'_1 y S'_2 , respectivamente. El descubrimiento de los primeros inhibidores de la ECA-I activos por vía oral a finales de 1970 es uno de los ejemplos clásicos de diseño racional de fármacos basado en la estructura.

Ondetti y Cushman propusieron un modelo del sitio activo de la ECA-I con el ion de zinc crítico, posicionado para activar el carbonilo escindible de los sustratos peptídicos. Este concepto clave, junto con el trabajo de Byers & Wolfenden (1972) en el que se demostró que el ácido D-2-bencilsuccínico era un potente producto inhibidor de la CPA, impulsó el diseño de compuestos similares. Estos compuestos son derivados de succinil aminoácidos, con estructura análoga al dipéptido con un grupo funcional succinil carboxilo capaz de unirse al zinc. Basándose en la secuencia de uno de los péptidos aislados del veneno de serpiente, Phe-Ala-Pro, Ondetti sintetizó el metil succinil Pro, que fue un inhibidor de ECA-I específico con un IC_{50} del orden micromolar (FIGURA 4).

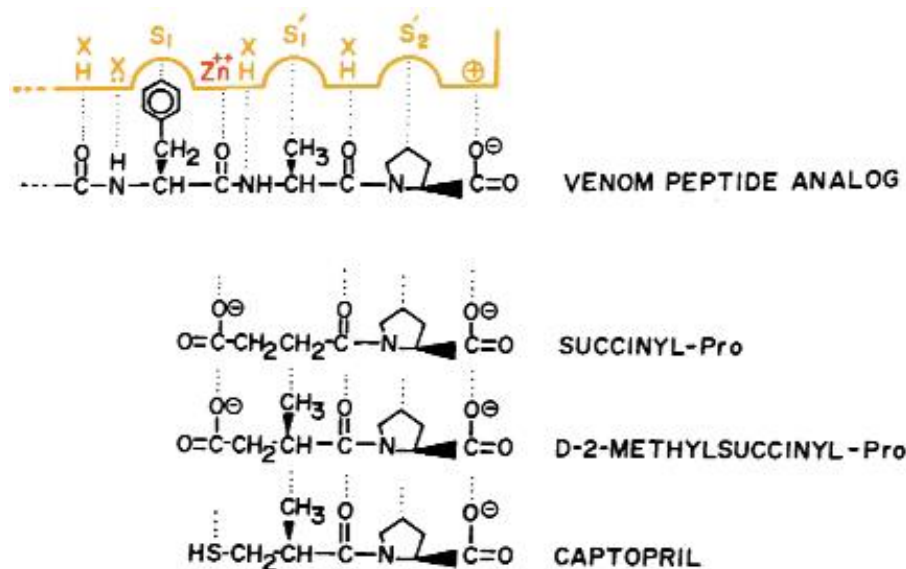


FIGURA 4. Diseño racional de inhibidores de ECA-I basados en el modelo propuesto del sitio activo de ECA-I basado de la estructura de la CPA (Cushman & Ondetti, 1999).

El reemplazo del grupo carboxilo de unión al zinc con un sulfhidrilo, Cushman y Ondetti lograron un inhibidor con mayor potencia y pusieron en marcha el «captopril» (inhibidor competitivo con una K_i de 1,7 nM). Los contactos propuestos de este inhibidor con los bolsillos $S1'$ y $S2'$ y la interacción del proil carboxilato con un residuo cargado positivamente del sitio activo (FIGURA 4) son notablemente similares a los observados en la estructura cristalina del complejo ECA-I-captopril obtenida casi 30 años más tarde (Cushman & Ondetti, 1999).

Actualmente se dispone de varios inhibidores de ECA-I que actúan como inhibidores competitivos. Estos inhibidores difieren en la estructura química del grupo activo, su potencia, biodisponibilidad y otras características farmacológicas.

1.2.3 Inhibidores de ECA-I derivados de proteínas alimentarias

Una alternativa natural (no farmacológica) y novedosa para el control de la PA y las enfermedades relacionadas, es el uso de péptidos bioactivos. Muchos péptidos con actividad inhibitoria de la ECA-I se han descubierto en hidrolizados enzimáticos de diferentes proteínas de

alimentos como caseína, proteínas de suero, de pescado, de soja, trigo (Kitts & Weiler, 2003) y proteínas de especies marinas (He, Liu, & Ma, 2013). Las proteínas de la leche representan una de las principales fuentes de un amplio rango de péptidos bioactivos (FitzGerald & Meisel, 2000) que cuentan con la ventaja adicional de poseer una amplia base de consumo y aceptabilidad por parte de la población.

1.2.3.1 Péptidos IECA-I obtenidos por hidrólisis enzimática de proteínas lácteas

Diferentes autores han logrado la liberación de péptidos inhibidores de la ECA-I a partir de proteínas lácteas por hidrólisis enzimática *in vitro* con diversas enzimas digestivas (Mullally, Meisel, & Fitzgerald, 1997), enzimas microbianas (Abubakar, Saito, Kitazawa, Kawai, & Itoh, 1998; Otte, Shalaby, Zakora, & Nielsen, 2007), procesos fermentativos (Gobbetti, Stepaniak, De Angelis, Corsetti, & Di Cagno, 2002; Fitzgerald & Murray, 2006; Nakamura et al., 1995) o por la digestión gastrointestinal de proteínas de la dieta (Foltz et al., 2007).

Las peptidasas de origen vegetal han sido menos empleadas para la producción de péptidos IECA-I. Recientemente se ha reportado la producción de péptidos IECA-I en hidrolizados de proteínas de lactosuero con papaína (Silva et al., 2014) así como con peptidasas vegetales no comerciales como las de flores de cardo (*Cynara cardunculus*) (Tavares & Malcata, 2013) y de *Arctium minus* (Cimino et al., 2015) o de frutos de *Maclura pomifera* (Bertucci et al., 2015).

Las propiedades de algunos péptidos inhibidores de la ECA-I con mayor potencia, derivados de proteínas lácteas se resumen en la TABLA 1 (FitzGerald et al., 2004).

TABLA 1. Propiedades de los péptidos inhibidores de la ECA-I derivados de proteínas lácteas. IC ₅₀ = concentración de inhibidor que causa un 50 % de inhibición de la ECA-I.			
Proteína	Fragmento peptídico	Secuencia primaria	IC ₅₀ (μM)
Casoquininas			
α _{s1} - caseína	F (25-27)	VAP	2,0
α _{s2} - caseína	F (174-179)	FALPQY	4,3
β-caseína	F (74-76)	IPP	5,0
κ-caseína	F (185-190)	VTSTAV	52,0
Lactoquininas			
α-Lactalbumina	F (104-108)	WLAHK	77,0
β-lactoglobulina	F (142-148)	ALPMHIR	42,6
BSA	F (208-216)	ALKAWSVAR	3,0

1.2.3.2 Relación estructura función de los péptidos IECA-I

La mayoría de los IECA-I presentan un tamaño que abarca entre dos y doce residuos de aminoácido.

La relación entre la estructura y la actividad no está completamente establecida pero se han determinado algunos rasgos estructurales característicos de estos inhibidores. Se cree que el tripéptido C-terminal es fundamental para la actividad y se ha observado que la presencia de residuos hidrofóbicos en cualquiera de las posiciones del tripeptido C-terminal es favorable. La presencia de residuos con carga negativa (Glu o Asp) en la posición C-terminal, así como la presencia de Pro en la penúltima posición C-terminal resultan desfavorables para la actividad IECA-I. Si el tripéptido presenta un residuo de Pro tanto en la posición C-terminal como en la tercera posición desde el extremo C-terminal, la estructura es favorable (Tavares & Malcata, 2013).

Un trabajo QSAR (modelo de la relación cuantitativa de la estructura y la actividad) realizado para establecer la relación de la secuencia de pentapéptidos y la actividad IECA-I predijo que el residuo en la posición C terminal es el más importante para determinar la potencia del inhibidor, seguido del residuo que se encuentra en la cuarta posición desde el extremo C-terminal. La presencia de residuos alifáticos y pequeños en la posición C terminal resultó favorable pero la presencia de Pro en la esta posición no tuvo un pronóstico favorable. Para la posición a cuatro residuos del extremo C terminal los residuos que tuvieron una predicción favorable fueron los hidrofóbicos voluminosos y los que contienen grupos sulfuro (Sagardia, Roa-Ureta, & Bald, 2013).

En otro modelo QSAR realizado con dipeptidos y tripéptidos se predijo que, en el caso de los dipeptidos son favorables los residuos con cadenas laterales voluminosas así como hidrofóbicas. Se sugiere que los residuos con cadenas laterales aromáticas y Pro son favorables en el extremo N-terminal y los residuos con cadenas laterales alifáticas ramificadas son favorables en la posición C terminal. Para los tripéptidos los residuos más favorables, tanto en el extremo C terminal como N terminal, fueron los residuos aromáticos mientras que los residuos con carga positiva fueron más favorables en la posición intermedia (Wu, Aluko, & Nakai, 2006).

1.2.3.3 Actividad *in vivo* de los péptidos IECA-I

Para lograr un efecto antihipertensivo *in vivo*, los péptidos inhibidores de la ECA-I deben alcanzar el sistema cardiovascular en una forma activa. Por lo tanto, luego de la administración oral deben resistir la degradación por las proteasas gastrointestinales y las peptidasas de los bordes en cepillo y deben ser absorbidos a través de la pared intestinal con preservación de su actividad fisiológica. Durante esta ruta de reparto oral, puede ocurrir la degradación de los péptidos, lo cual resultará en una activación o desactivación de su actividad biológica. Esto explica parcialmente la discrepancia entre la actividad inhibitoria de la ECA-I y el efecto antihipertensivo luego de la administración de un hidrolizado de proteínas alimentarias (Korhonen & Pihlanto, 2006).

La evidencia científica del efecto hipotensor en humanos de los péptidos con actividad IECA-I *in vivo* es controversial (Geleijnse & Engberink, 2010; Boelsma & Kloek, 2009). Resulta complejo evaluar el efecto de un alimento en la salud, entre otras cosas porque es difícil cuantificar el principio activo en el alimento, puede haber interacciones con la matriz alimentaria y el consumo de un alimento puede provocar cambios en la dieta. En los estudios que se obtienen resultados positivos se informa que el efecto hipotensor máximo observado fue de 13 mm Hg (presión sistólica) y 8 mm Hg (presión diastólica) luego de 8-12 semanas de tratamiento y comparado con placebo. Las dosis efectivas van desde 3,07 a 52,5 mg/d y deben ser consumidos durante una a dos semanas para comenzar a ver los efectos. Otras cualidades reportadas de los lactopeptidos son: no tienen efecto sobre la presión sanguínea normal, son efectivos solo a presiones sanguíneas elevadas, no se constataron diferencias en la efectividad de acuerdo a la etnia y su actividad no es afectada por el uso de otra medicación antihipertensiva (principalmente antagonistas de calcio, β -bloqueantes e inhibidores de la ECA-I). En cuanto a la seguridad y toxicidad de los lactopéptidos se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran su inocuidad (Boelsma & Kloek, 2009).

1.3 Lactosuero

El LS es un coproducto que se obtiene cuando se elimina la caseína de la leche. Esto puede lograrse por microfiltración, por la acción de la enzima quimosina (renina) y/o la acidificación de la leche a pH 4,6. El LS conserva el 20 % de las proteínas, 95 % de la lactosa, y 8 % de los lípidos de la leche.

De acuerdo al proceso de obtención se distinguen dos tipos de LS: LS ácido y LS dulce (TABLA 2). El LS ácido es el obtenido como consecuencia de la precipitación isoeléctrica de la caseína por acidificación de la leche a pH 4,6. El LS ácido se obtiene como coproducto de elaboración de quesos frescos, donde la acidificación ocurre por fermentación de una cantidad significativa de lactosa a ácido láctico, o por la acidificación directa de la leche para la preparación de caseína/caseinatos. El LS dulce se produce cuando la coagulación de la caseína ocurre por la hidrólisis de la κ -caseína con quimosina, que induce la desestabilización de las micelas, en el proceso de elaboración de quesos de masa dura o semidura, o en la producción de caseína (Bansal & Bhandari, 2016).

Tabla 2. Características de LS ácido y dulce (Rojas & Torres, 2013) (Bansal & Bhandari, 2016).		
Componente	LS dulce	LS ácido
Sólidos totales (g/L)	63-70	63-70
Proteínas totales (g/L)	6,5- 6,6	6,1- 6,2
GMP (g/L)	1,2-1,5	-
NNP (g/L)	0,27- 0,37	0,30- 0,40
Lactosa (g/L)	46,0- 52,0	44,0- 47,0
Materia grasa (g/L)	0,20- 0,50	0,30
Minerales (g/L)	5,00- 5,20	7,50- 7,90
Calcio (g/L)	0,40- 0,60	1,20- 1,60
Fosfato (g/L)	0,50- 1,00	2,00
Sodio (g/L)	0,50- 0,53	0,50- 0,51
Cloruros (g/L)	1,10	1,10
Lactato (g/L)	2,00	6,40
pH	5,90- 6,40	4,60- 4,70

GMP= glicomacropéptido o fragmento C-ter (f106-169) producido por la hidrólisis de la κ -CN con renina; NNP= nitrógeno no proteico.

1.3.1 Proteínas del LS

Las proteínas de la leche pueden subdividirse en dos grupos o familias, las caseínas y las proteínas del LS (TABLA 3). Las caseínas son fosfoproteínas, que precipitan por acidificación de la leche a pH 4,6 a 20 °C. Son las proteínas mayoritarias de la leche, representando el 80 % de las proteínas totales. Las proteínas del LS son las proteínas de la leche que permanecen solubles al acidificar la leche en las condiciones antes mencionadas. β -lactoglobulina (BLG), α -lactalbumina (ALA), albúmina sérica bovina y las inmunoglobulinas son los componentes mayoritarios de este grupo. Las proteínas minoritarias incluyen a lactoferrina (LF), plasmina (PL) y lactoperoxidasa (LP). Algunos péptidos producidos por la hidrólisis de las caseínas, que son solubles al pH del LS, también se incluyen entre las proteínas del LS y se conocen como fracción proteosa-peptona (Farrell et al., 2004).

TABLA 3. Composición proteica de la leche bovina.					
	Proteína	Concentración (g/L)	Variantes genéticas	Masa molecular (Da)	Punto Isoeléctrico
CASEÍNAS	α_{s1} -Caseína	12-15	B	23.615	4,44-5,76
			C	23.542	-
	α_{s2} -Caseína	3-4	A	25.226	-
	β -Caseína	9-11	A	23.983	4,83-5,07
	K-Caseína	2-4	A	19.037	5,45-5,77
			B	19.006	5,3-5,8
PROTEÍNAS DEL SUERO	α -Lactalbumina	0,6-1,7	B	14.178	4,2-4,5
	β -Lactoglobulina	2-4	A	18.363	5,13
			B	18.277	5,13
	Albúmina sérica bovina	0,4	A	66.399	4,7-4,9
	IgG1	0,3-0,6	-	161.000	5,5-6,8
	IgG2	0,05	-	150.000	7,5-8,3
	IgA	0,01	-	385.000-417.000	-
	IgM	0,09	-	1.000.000	-
Lactoferrina	0,02-0,1	-	76.110	8,81	

1.3.2 β -Lactoglobulina

Es una de las proteínas más abundantes de la leche (12 %), representando el 50 % de las proteínas del LS. Está presente en la leche de rumiantes y otros animales como canguro, delfín, manatí y yegua. Sin embargo, la leche de humano, rata, ratón y cobayo carece de BLG.

La función biológica de BLG no está totalmente clara. Debido a que se ha demostrado su capacidad para unir ligandos, que pueden ser moléculas hidrofóbicas o anfipáticas así como péptidos pequeños, algunos autores han propuesto que su rol es el de transportar moléculas.

1.3.2.1 Estructura molecular

Su estructura monomérica está compuesta por 162 residuos de aminoácido que corresponde a una masa molecular de 18.300 Da. En la FIGURA 5 se muestra un diagrama de la estructura primaria y secundaria. Tiene dos puentes disulfuro ($Cys_{66} - Cys_{160}$ y $Cys_{106} - Cys_{119}$) y un tiol libre Cys_{121} . En la leche bovina se han identificado cuatro variantes genéticas de BLG que se denominan A, B, C y D. Las variantes A y B son las más comunes y están presentes con la misma frecuencia (Sawyer, 2013). La diferencia entre las variantes A y B se limita al cambio de dos residuos de aminoácido, $Asp_{64}Gly$ y $Val_{118}Ala$ respectivamente, que causa importantes efectos en su solubilidad.

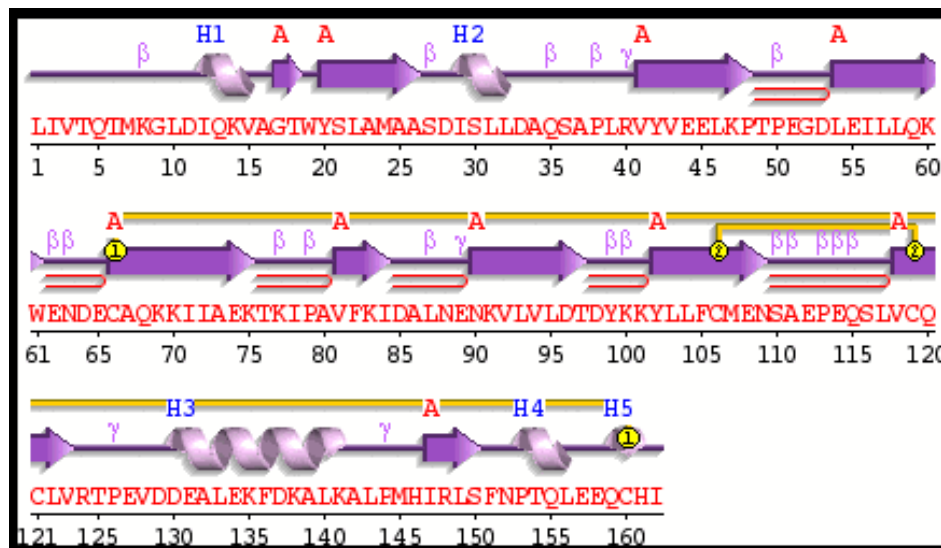


FIGURA 5. Estructura primaria y secundaria de BLG extraídas de PDBsum (Laskowski et al., 1997). Corresponden a la estructura tridimensional de BLG A obtenida por difracción de rayos X y depositada en el RCSB PDB con el código 2Q2M (Qin et al., 1998).

Existen varias estructuras tridimensionales de BLG, obtenidas por difracción de rayos X y resonancia magnética nuclear, depositadas en RCSB PDB [URL www.rcsb.org (Berman et al., 2000)].

BLG es una proteína globular y en su forma monomérica presenta una estructura secundaria con predominio de hebras β y estructuras desordenadas, respecto a las estructuras helicoidales (FIGURA 5). Ocho de las nueve hebras β anti paralelas, las hebras A, B, C, D, E, F, G y H, forman un barril β . Este barril presenta una gran cavidad accesible al solvente rodeada de residuos hidrofóbicos (Kontopidis, Holt, & Sawyer, 2004). BLG pertenece a la familia de las lipocalinas, con la que comparte la estructura de barril β y la cavidad en la que puede unir moléculas pequeñas hidrofóbicas (Flower, North, & Sansom, 2000). La hebra restante (hebra I) forma parte de la interface de la estructura dimérica junto con el giro que une las hebras A y B (giro AB). Entre las hebras I de cada monómero se establecen cuatro puentes de hidrógeno (FIGURA 6A). Además, como se puede observar en la FIGURA 6B, los giros AB de cada monómero interactúan a través de ocho puentes de hidrógeno adicionales, y entre el *Asp*₃₃ y la *Arg*₄₀ del giro AB se forman dos pares iónicos intermonómero fundamentales (Sakurai & Goto, 2002).

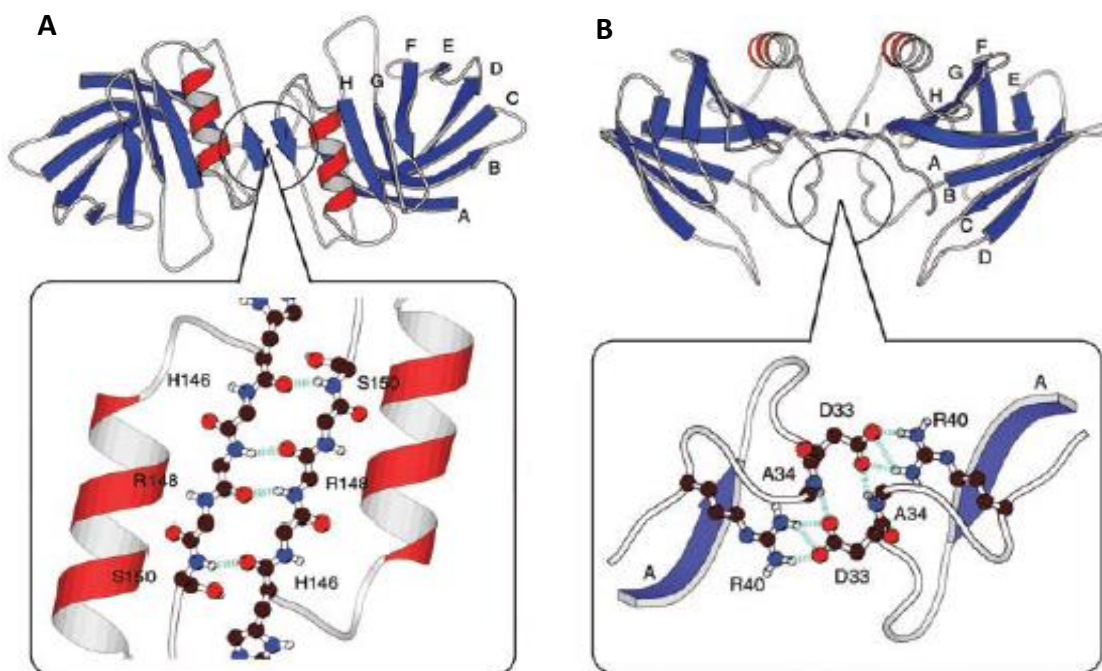


FIGURA 6. Modelo de las interacciones en la interface del dímero de BLG realizado por Sakurai & Goto (2002) basada en la estructura por rayos X PDB ID 1BEB. Vistas aumentadas de las interacciones por puentes de hidrógeno entre las hebras I de cada monómero (A) y los puentes salinos entre *Asp*₃₃ y la *Arg*₄₀ del giro AB de cada monómero (B).

1.3.2.2 Transición de Tanford

BLG sufre un cambio conformacional entre pH 6 y 8, que fue observado al comparar las estructuras tridimensionales resueltas por Qin et al. (1998) a pH 6,2 (PDB ID 3BLG) y 7,1 (PDB ID 1BSY). Estos autores definieron la transición Tanford como un cambio conformacional en el giro que une las hebras E y F (giro EF). Este giro está localizado en el extremo abierto de la cavidad hidrofóbica. A pH 6,2 el giro EF se dispone en una conformación cerrada impidiendo el acceso a la cavidad hidrofóbica, mientras que a pH 7,2 adopta una conformación (abierta) permitiendo la entrada a la cavidad. En estos cambios está involucrado el grupo carboxilo del residuo de *Glu*₈₉ localizado en el giro EF, que presenta un valor de pK_a anormal de 7,3 en lugar de 4,5. Este grupo a pH 6,2 está orientado hacia el interior de la cavidad, mientras que entre pH 7,1 y 8,2 se expone al exterior causando la transición de Tanford (FIGURA 7).

Un modelo más reciente y detallado para la transformación de Tanford se basó en las estructuras, obtenidas por difracción de rayos X, de BLG con la mutación *Ala*₃₄*Cys* que estabiliza el dímero (Sakurai & Goto, 2006). Este modelo define cuatro estructuras con diferente conformación involucradas en la apertura de la cavidad, tres de ellas (*C*_I, *C*_{II} y *C*_{III}) con una conformación cerrada y la restante correspondiente a la conformación abierta del giro EF. Ellos observaron que el cambio conformacional del giro EF involucra dos transiciones que pueden distinguirse tanto en la escala de tiempo así como en la posición del giro (en la parte alta y en la región de bisagra). Además el giro GH, que es adyacente al giro EF, muestra cambios conformacionales a pH cercano a 7, que son anteriores al movimiento del giro EF que lleva a la conformación abierta. El

mecanismo propuesto consta de tres pasos secuenciales, que involucran el cambio conformacional de giro GH, la ruptura de enlaces de hidrógeno en la región bisagra del giro EF y el movimiento del giro EF que produce la apertura de la cavidad.

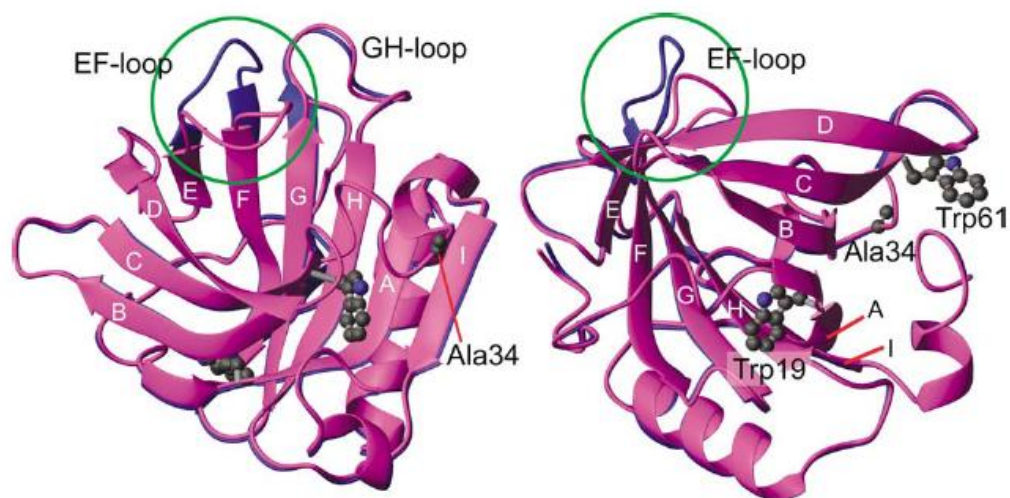


FIGURA 7. Estructuras cristalinas de BLG resueltas por Qin et al. (1998) a pH 6,2 (PDB ID 3BLG, en magenta) y a pH 7,1 (PDB ID 1BSY, en azul) superpuestas (Sakurai & Goto, 2006). Se señala con un círculo verde la apertura de la cavidad con el movimiento del giro EF.

También se observan cambios en la reactividad del tiol de la Cys_{121} libre a pH mayores a 6,7, pero se vio que esto no está directamente relacionado con la apertura de la cavidad. Se ha postulado que estos cambios conformacionales y la unión reversible de ligandos están relacionados con el transporte por el tracto digestivo en una forma protegida para luego ser liberados en el intestino. Dado el pH ácido del estómago, la cavidad permanecería cerrada y el ligando protegido para luego ser liberado en el intestino donde el pH es alcalino y la cavidad adoptaría la conformación abierta (Sakurai & Goto, 2006).

1.3.2.3 Reacciones de asociación y disociación

BLG es una proteína que cambia su estado de agregación en función de las condiciones del medio. A temperatura ambiente y en las condiciones de pH (neutro), fuerza iónica y concentración de la leche se presenta mayoritariamente en forma de dímero. A concentraciones de BLG menores a 10 mg/mL y pH ácido, los dímeros se disocian a monómeros. La baja fuerza iónica, baja concentración proteica y el aumento de la temperatura favorecen la disociación a monómeros. A pH mayor a 7,5 los dímeros también se disocian y según Zimmerman, Barlow, & Klotz (1970) la proteína se «hincha» (FIGURA 8).

Entre pH 3,7 y 5,1, los dímeros de BLG pueden asociarse formando octámeros, esto ocurre principalmente a bajas temperaturas (menores a 20 °C). Esta reacción de asociación es un equilibrio rápido que ha sido bien caracterizado (FIGURA 4). Sin embargo, hasta el momento no se ha podido obtener una estructura de rayos X completa del octámero. La concentración de

octámero es máxima a pH 4,6 y se ha establecido que el descenso de la temperatura (Gottschalk, Nilsson, Roos, & Halle, 2003), la disminución de la fuerza iónica y el aumento de la concentración proteica favorecen la asociación (Verheul, Pedersen, Roefs, & De Kruif, 1999).

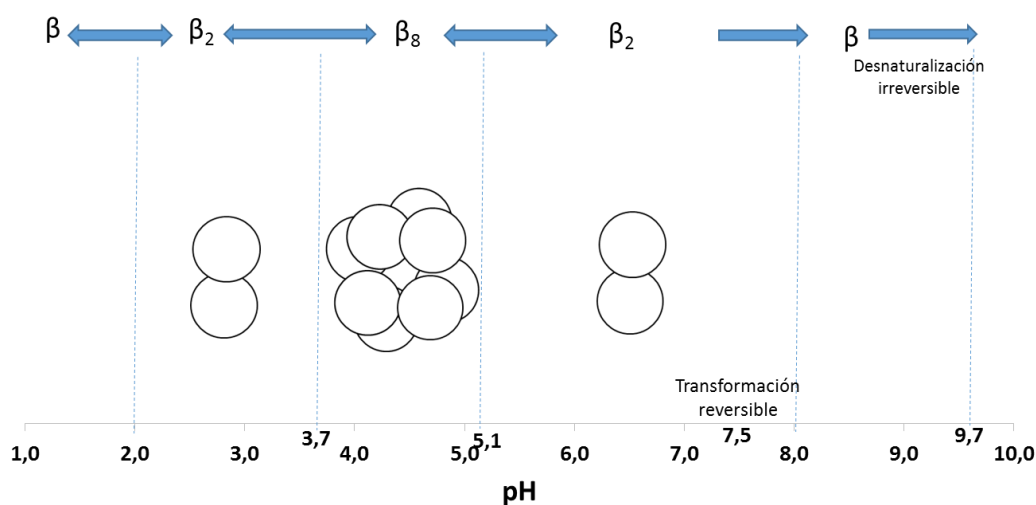


FIGURA 8. Esquema de asociación molecular de BLG en función del pH y temperatura del medio (Pessen, Purcell, & Farrell, 1985).

En el rango de pH de 8,5 a 9,5 ocurren cambios en la estructura de BLG que se dan lentamente. A pH mayor a 8,5 se da la disociación reversible de los dímeros. Mientras que a pH mayores a 9 van ocurriendo cambios irreversibles, que finalmente conducen a la desnaturalización y agregación de BLG, en un proceso que es dependiente del tiempo (FIGURA 8). En estos cambios irreversibles están implicadas reacciones de oxidación de tioles y/o reacciones de intercambio tiol-disulfuro debido a que la agregación es inhibida por el bloqueo de los grupos tiol.

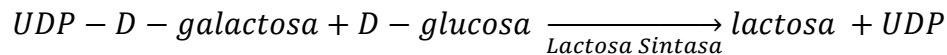
1.3.2.4 Efecto de la temperatura en la estructura nativa

El proceso de desnaturalización térmica de BLG es complejo y depende del pH, la concentración de proteína, la fuerza iónica y la presencia de ligandos. La disminución del pH y la unión de ligandos son factores que hacen a BLG más resistente a la desnaturalización térmica. A pH neutro, BLG está en estado dimérico y la transición del desplegamiento térmico ocurre aproximadamente a 70 °C. Los dímeros se disocian a monómeros, para luego desplegarse y finalmente asociarse con otras moléculas a través del tiol libre de la *Cys*₁₂₁ y de residuos hidrofóbicos. A pH más bajo, con BLG en estado monomérico, ocurre una desnaturalización reversible a temperaturas de hasta 70 °C. A temperaturas que superan los 70 °C se forman agregados grandes y que involucran predominantemente interacciones no covalentes (Edwards, Creamer, & Jameson, 2008).

1.3.3 α-Lactalbúmina

Representa la segunda proteína más abundante del LS bovino (20 %), es la proteína principal de la leche humana y se encuentra en la leche de todos los mamíferos.

ALA cumple una función biológica muy importante en las células de la glándula mamaria. Forma parte del sistema enzimático lactosa sintasa que cataliza el paso final en la biosíntesis de lactosa:



Este sistema enzimático consta de dos proteínas, la galactosil transferasa que es el componente catalítico y ALA que es el componente regulador. En ausencia de ALA, la galactosil transferasa es inespecífica, transfiriendo la galactosa de la UDP-galactosa a diferentes aceptores. En presencia de ALA se vuelve muy específica y transfiere la galactosa principalmente a la glucosa para dar lactosa. De esta forma ALA actuando como regulador que puede controlar el nivel de lactosa en la leche (Permyakov & Berliner, 2000).

1.3.3.1 Estructura molecular

ALA es una proteína ácida (punto isoeléctrico= 4,5), monomérica y pequeña de 123 residuos de aminoácido (14.200 Da), que es homóloga a la lisozima tipo C. La leche bovina solo tiene una variante genética, ALA B, pero la leche de otras especies presenta la variante A. La variante genética B tiene un residuo de glutámico en lugar de un de arginina.

ALA es una metaloproteína que une fuertemente un ion calcio en un bolsillo que contiene residuos de Asp. Se trata de una proteína globular en la que predominan las hélices- α y las zonas de plegamiento desordenado respecto a las hebras- β (FIGURA 9).

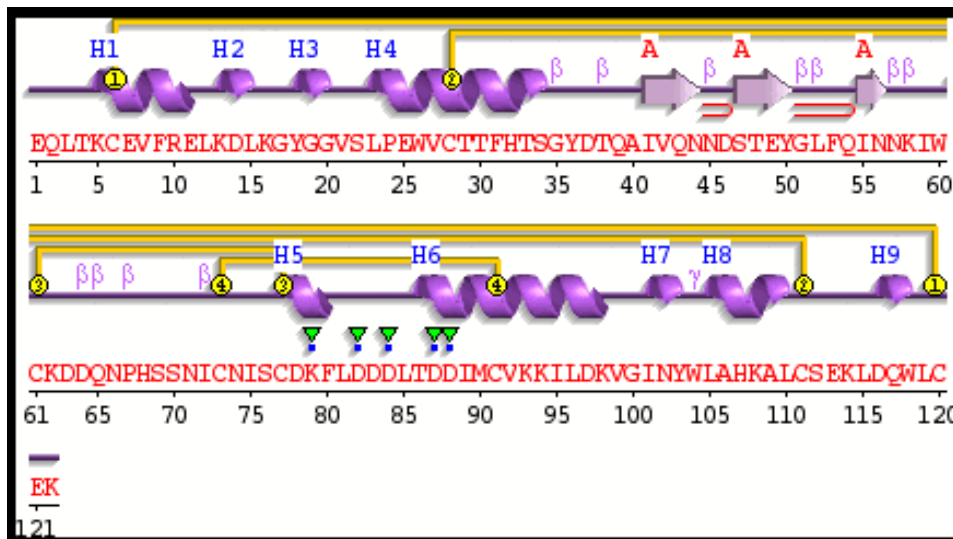


FIGURA 9. Estructuras primaria y secundaria de ALA extraídas de PDBsum (Laskowski, R A, Hutchinson, E G, Michie, A D, Wallace, A C, Jones, M L & Thornton, J M, 1997). Corresponden a la estructura tridimensional de ALA A obtenida por difracción de rayos X y depositada en el RCSB PDB con el código 1F6S (Chrysin, ED., Brew, K. & Acharya, R., 2000).

La estructura terciaria de ALA nativa está compuesta por dos subdominios: un subdominio de α -hélices (lóbulo α) y un subdominio, más pequeño, de hebras- β (lóbulo β) que están conectados por una hendidura (FIGURA 10, Chrysin, Brew, & Acharya, 2000). El lóbulo α está formado por las regiones N-terminal y C-terminal de la proteína (residuos 1-34 y 86-123) y presenta tres α -hélices (residuos 5-11, 23-34 y 86-98) y dos hélices 3_{10} (residuos 18-20 y 115-118). El lóbulo β , formado

por la parte central de la proteína (residuos 35-85) presenta tres hebras β que forman una hoja β anti paralela (residuos 41-44, 47-50 y 55-56), una hélice 3_{10} (residuos 77-80) y estructuras desordenadas. La estructura está estabilizada por cuatro puentes disulfuro, ligando la Cys_6 con Cys_{120} , Cys_{28} con Cys_{111} , la Cys_{61} con Cys_{77} y la Cys_{73} con Cys_{91} (Edwards et al., 2008).

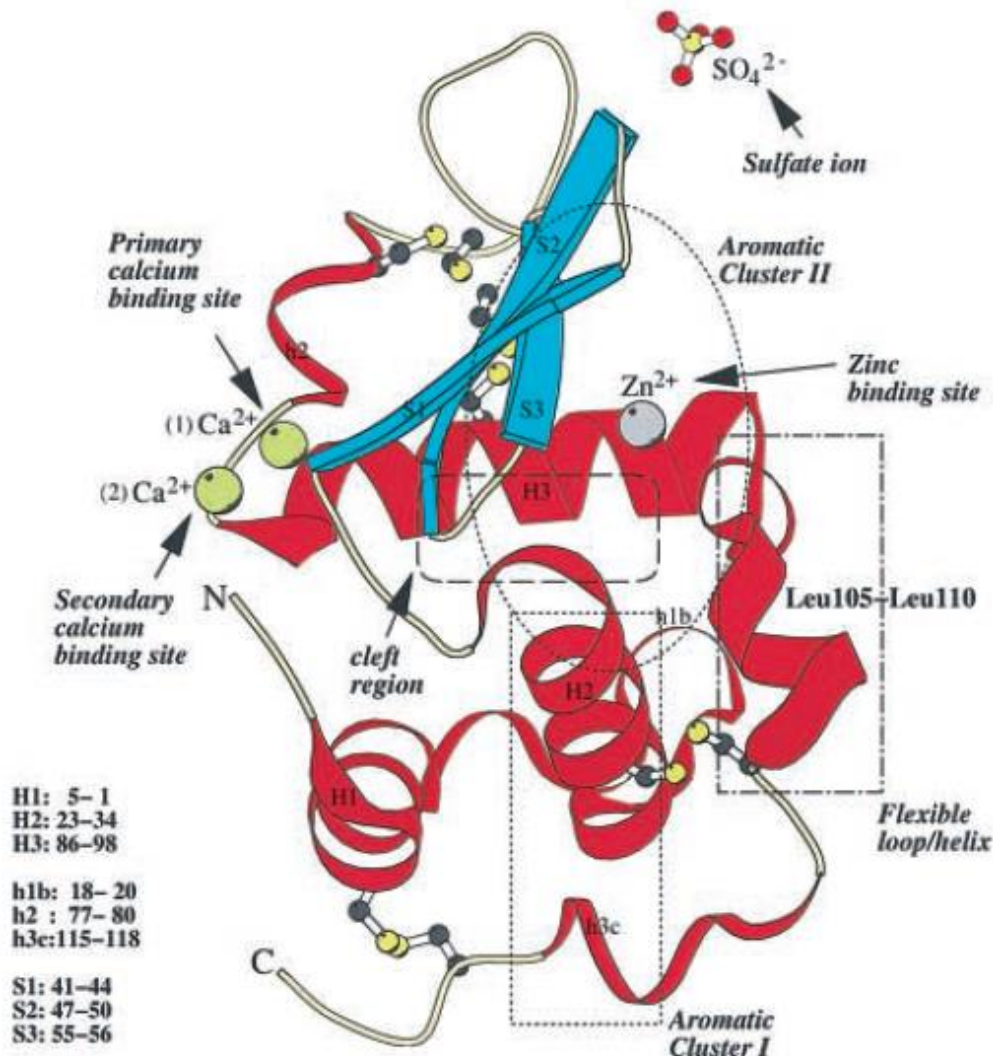


FIGURA 10. Estructura tridimensional de ALA bovina (Chrysin et al., 2000). Se indican las regiones funcionales de la proteína (sitios de unión a metales) y los elementos de estructura secundaria: α -hélices (H), hebras- β (S), hélices 3_{10} (h).

En la unión de los subdominios se encuentran el sitio de unión al Ca^{2+} de alta afinidad que constituye una sección continua de la cadena polipeptídica (residuos 79-88) conectando a la hélice 3_{10} del lóbulo β (residuos 77-80) con la hélice H3 del lóbulo α (residuos 86-98). A 7,9 Å de distancia del sitio de unión al Ca^{2+} de alta afinidad se encuentra un sitio de unión al Ca^{2+} secundario.

El calcio acelera la velocidad de renaturalización de ALA desnaturaliza por calor (con los puentes disulfuro intactos) por más de dos órdenes de magnitud (Chrysin et al., 2000). A pH muy ácido ($pH < 3$) ocurre la llamada «transición ácida» en la que los residuos de Asp se protonan y el Ca^{2+}

se disocia. En estas condiciones, ALA adopta el estado de glóbulo fundido² que corresponde a un estado en el que se conservan los elementos de la estructura secundaria y la estructura terciaria mantiene su forma globular pero se ve como «hinchada» respecto a la forma nativa (Kuwajima, 1996). A temperaturas superiores a la de desnaturalización por transición térmica o en presencia de concentraciones moderadas de agentes desnaturalizantes, ALA también adopta la conformación de glóbulo fundido (Boye, Alli, & Ismail, 1997).

² En inglés: molten globule.

2 HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis de trabajo

El uso de peptidasas no comerciales, extraídas de la planta autóctona, *Bromelia antiacantha* Bertol., para la hidrólisis enzimática de las proteínas del lactosuero, producirán péptidos inhibidores de ECA-I diferentes a los ya obtenidos empleando peptidasas microbianas o de origen animal (gastrointestinales).

2.2 Objetivo general

Contribuir al desarrollo y caracterización de nuevos péptidos con actividad inhibitoria de la ECA-I, liberados de las proteínas de lactosuero por procesos de hidrólisis enzimática.

2.3 Objetivos específicos

1. Obtener hidrolizados enzimáticos de proteínas de lactosuero, utilizando enzimas proteolíticas de producción nacional y/o de vegetales de la flora autóctona o endémica.
2. Fraccionar los péptidos producidos según el objetivo 1, mediante procesos de filtración por membrana.
3. Identificar las fracciones con actividad inhibitoria de la ECA-I *in vitro*.
4. Purificar los péptidos inhibidores de la ECA-I.
5. Caracterizar el o los péptidos inhibidores (determinación de IC_{50} , tipo de inhibidor, K_i , secuencia aminoacídica, hidrofobicidad)
6. Evaluar la estabilidad de los péptidos inhibidores de ECA-I a la digestión gastrointestinal, *in vitro*.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Hidrólisis de proteínas de LS con PepBA

3.1.1 Materiales

ALA, BLG, ECA-I de pulmón de conejo, papaína de látex de papaya, O-ftaldialdehído (OPA), L-leucina, marcador de peso molecular (Tricina SDS-PAGE Ultra-Low Range), hipuril-histidil-leucina (HHL), Iodoacetamida (IAA), beta-mercaptoetanol (BME) y ácido tricloroacético (TCA) fueron provistos por Sigma Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. El LS se preparó en el laboratorio por precipitación isoeléctrica de la caseína. La leche bovina descremada (Conaprole, Uruguay) se acidificó con HCl 6 M hasta pH 4,5 y se precipitó completamente durante toda la noche a 4 °C. Finalmente se separó el LS filtrando por gasa y se almacenó a -20 °C.

3.1.2 Preparación del extracto crudo de *B. antiacantha*

El extracto crudo (ECBA) de *B. antiacantha* se preparó según Vallés, Furtado, & Cantera (2007). Los frutos maduros congelados (1014 g) se lavaron y pelaron. La pulpa, a la que previamente se le quitó la capa fibrosa que la recubre y las semillas, se trituró en un mixer doméstico durante 1 min (en intervalos de 10 s con igual tiempo de espera) en frío (0-4°C). El homogenato se centrifugó a 8.000 g durante 20 min a 4 °C. Se separó el sobrenadante al que se denominó ECBA y se almacenó a -20 °C.

3.1.3 Preparación del extracto parcialmente purificado de *B. antiacantha*

El ECBA se precipitó con cuatro volúmenes de acetona (enfriada a -20 °C), en baño de hielo-agua. Se incubó a -20°C durante 30 min y se centrifugó a 8.000 g durante 20 min a 4°C. Los sobrenadantes se descartaron y los precipitados fueron secados hasta evaporar completamente la acetona. Los precipitados cetónicos se disolvieron usando el volumen de buffer adecuado. Antes de determinar la actividad proteolítica los precipitados redisolultos se activaron con cisteína a una concentración final de 15 mM. Este extracto parcialmente purificado se denominó PepBA.

3.1.4 Actividad proteolítica

La actividad proteolítica del preparado enzimático de *B. antiacantha* se determinó usando azocaseína como sustrato de acuerdo al método descrito por Andrews & Asenjo (1986). La mezcla de 340 µL de buffer fosfato de sodio 0,2 M, pH 7,5 con 340 µL de una solución de azocaseína al 1 % (p/v) y se termostatóizó en un baño de agua a 37 °C durante cinco min. Se agregaron 340 µL de la dilución adecuada del preparado enzimático y se dejó reaccionar durante 10 min a 37 °C. Para detener la reacción se agregaron 340 µL de una solución de TCA al 10 % (p/v) y se incubó 20 min a 37 °C para asegurar la precipitación completa. Paralelamente, se prepararon blancos en los que el agregado de TCA 10 % se realizó previamente al agregado del preparado enzimático. Las muestras y los blancos se centrifugaron durante 30 min a 11.000 g. Se midió la absorbancia a 337 nm de los sobrenadantes utilizando los blancos para fijar el valor de absorbancia cero. Se definió la unidad de enzima (UE) como la cantidad de enzima necesaria

para producir el aumento de la absorbancia a 337 nm en una unidad por minuto de reacción en las condiciones del ensayo.

3.1.5 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976). Las curvas de calibración se realizó utilizando albúmina sérica bovina (BSA). De acuerdo a la concentración de las muestras se utilizó el ensayo estándar (rango de concentración de BSA de 0,1 a 1,0 mg/mL) o el micrométodo (rango de concentración de BSA de 10 a 100 µg/mL).

3.1.6 Hidrólisis enzimática de las proteínas del lactosuero con PepBA

Se evaluó el efecto de las condiciones de reacción en la extensión de la hidrólisis del LS (grado de hidrólisis) para seleccionar las condiciones que favorezcan la producción de un hidrolizado rico en péptidos de masa inferior a 3,0 kDa. La hidrólisis del LS con PepBA se realizó a diferentes relaciones de unidades de enzima/ mg de proteína del sustrato (E/S), pH (4,5; 7,5 y 9,2) y temperatura de reacción (30, 40 y 50 °C) en un baño de agua termostatzado y agitación constante (220 rpm) (Polystat µPros, Bioblock Scientific, Francia). En todos los casos se añadió 0,1 mL de PepBA (en la dilución adecuada de acuerdo a las unidades de enzima deseadas) a 10 mL de LS (9,8 mg/mL de proteína). A diferentes tiempos de digestión, se tomaron alícuotas de 250 µL, que se mezclaron con 500 µL de TCA 10 % (p/v) e incubaron a temperatura ambiente durante 20 min. El sobrenadante obtenido por centrifugación (5.000 g durante 10 min) fue utilizado para la cuantificación de grupos aminos primarios por el método de OPA (que se describe en la sección 3.1.8) para la determinación del grado de hidrólisis (DH).

3.1.7 Grado de Hidrólisis

Para evaluar la extensión de la hidrólisis se calculó el DH, es decir el porcentaje de enlaces peptídicos del sustrato que fueron hidrolizados, definido como:

$$DH (\%) = \frac{n}{n_{tot}} \times 100 \text{ [Ecuación 1]}$$

Donde n es el número de enlaces peptídicos que se escindieron por la acción enzimática y n_{tot} es el número total de enlaces peptídicos del sustrato.

El número de enlaces peptídicos escindidos se calculó a partir del número de grupos amino primarios liberados durante la hidrólisis, que permanecen solubles luego de precipitar las proteínas con TCA. El número de enlaces peptídicos totales del sustrato fue determinado a partir del número de amino primarios liberados luego de la hidrólisis total del sustrato.

3.1.8 Hidrólisis total

Se colocaron partes iguales de LS y ácido clorhídrico concentrado (14 M) en tubos sellados y se incubaron a 110 °C durante 20 horas. El hidrolizado ácido fue centrifugado a 5000 g durante 10

min y el sobrenadante se utilizó para la cuantificación de aminos primarios por el método de OPA (descrito en 3.1.8).

3.1.9 Determinación de grupos aminos primarios

La concentración de grupos amino primarios se determinó utilizando el método de OPA (Church, Swaisgood, Porter, & Catignani, 1983). Se agregaron 20 μL de muestra a 1,0 mL de reactivo de OPA en una cuveta de cuarzo, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por dos minutos. El producto formado se cuantificó por espectrofotometría a 340 nm utilizando un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Japón).

El DH se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$DH (\%) = \frac{A_t - A_0}{A_{tot}} \times 100 \text{ [Ecuación 2]}$$

Siendo A_t la absorbancia a 340 nm proporcional a la concentración del producto de la reacción de los aminos con OPA a un tiempo dado de hidrólisis; A_0 la correspondiente al tiempo inicial de hidrólisis y A_{tot} la correspondiente a la hidrólisis total del sustrato.

3.1.10 Susceptibilidad y mecanismo de hidrólisis de ALA y BLG en función de las condiciones de reacción

Para evaluar que ocurrió con ALA y BLG durante la hidrólisis de LS con PepBA se realizó el análisis electroforético por SDS-PAGE con geles de tricina (Tricine SDS-PAGE).

3.1.10.1 Tricina-SDS PAGE

La reacción de hidrólisis se siguió por electroforesis Tricina SDS-PAGE de acuerdo al método descrito por Schägger (2006). Se tomaron alícuotas de 90 μL de hidrolizado a diferentes tiempos durante la reacción de hidrólisis de LS que se mezclaron con 10 μL de IAA 100 mM y se incubaron 15 minutos a 40 ° C. Las muestras (5-7 μL) se cargaron en un sistema compuesto por: gel de separación (T = 16,5 %, C = 3 %, 6 M urea), gel espaciador (T= 10 % y C = 3 %) y gel concentrador (T = 4 % y C = 3 %). Se empleó un estándar de masa molecular de rango ultrabajo (Sigma) compuesto por la mezcla de: triosa fosfato isomerasa de musculo de conejo (26.600 Da), mioglobina de corazón de caballo (17.000 Da), alfa lactalbúmina de leche bovina (14.200 Da), aprotinina de pulmón bovino (6.500 Da), cadena beta oxidada de insulina bovina (3.496 Da) y bradiquinina (1.060 Da). Los geles se corrieron empleando una cuba Mini PROTEAN Tetra (Bio Rad Laboratories Inc, Hercules CA, USA). El voltaje se fijó en 30 V hasta que las muestras salieron del gel concentrador y luego se aumentó a 90 V y se mantuvo hasta que terminó la corrida. Los geles se tiñeron con Azul Brillante de Coomassie, se escanearon y analizaron utilizando ImageJ

para Windows (Rasband, 2015). El porcentaje de proteína intacta para cada tiempo de hidrólisis evaluado se calculó a partir del área de la banda de ALA o BLG, tomando como 100 % el área de la banda de estas proteínas a tiempo inicial (0 min).

3.1.10.2 Cinética de la proteólisis

Los estudios cinéticos de la hidrólisis de ALA y BLG con PepBA y papaína se realizaron a diferentes valores de pH a 50 °C. Las soluciones de enzimas y sustratos para realizar los ensayos a los diferentes pH de reacción se disolvieron usando: buffer acetato de sodio 0,1 M, pH 4,5; buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,5 o buffer de borato de sodio 0,1 M, pH 9,2. La reacción se inició con el agregado de 50 µL de PepBA ($3,6 \times 10^{-5}$ M) o papaína ($1,4 \times 10^{-4}$ M) a 450 µL de sustrato de diferente concentración ($3,2 \times 10^{-5}$ a $7,6 \times 10^{-4}$ M para ALA y $2,5 \times 10^{-5}$ a $5,9 \times 10^{-4}$ M para BLG). Se tomaron alícuotas de 50 µL a tiempo cero y cada 30 segundos de reacción (hasta un tiempo total de 3 minutos) y se añadieron 100 µL de TCA 10 % (p/v) para detener la reacción. Los sobrenadantes se separaron por centrifugación a 6000 g y 4 ° C durante 10 min. La velocidad inicial de reacción se determinó midiendo el aumento de la concentración de grupos aminos primarios (sección 2.2.1.2.) en los sobrenadante de las alícuotas tomadas a los diferentes tiempos. La concentración de aminos primarios se calculó a partir de una curva de calibración realizada con L-leucina y expresada como moles/L equivalentes de L-leucina. La velocidad inicial (M/s) se graficó en función de la concentración molar de sustrato (Gráficos de Michaelis y Menten). Los parámetros cinéticos se determinaron a partir del ajuste no lineal (hipérbola) de los gráficos utilizando el programa OriginPro 2016 (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

3.2 Caracterización de los hidrolizados de proteínas de LS

3.2.1 Preparación de hidrolizados de LS, ALA y BLG

Se prepararon hidrolizados de LS y de sus proteínas mayoritarias en las concentraciones habituales en el LS (ALA, 1,3 mg/mL y BLG 3,3 mg/mL) y utilizando las condiciones de reacción previamente optimizadas. Se tomaron alícuotas de hidrolizados obtenidos a los 0, 30, 60 y 120 minutos de reacción, se calentaron a 95 °C durante 15 minutos para inactivar las enzimas y se centrifugaron a 16.000 g y 4 °C durante 10 min. Los sobrenadantes resultantes se fraccionaron por ultrafiltración usando los dispositivos Amicon Ultra-4 3K (Millipore, USA) con membranas de corte en 3 kDa o Vivaspin 15 R (Sartorius, Alemania) de corte en 2 kDa. Las muestras se centrifugaron a 7000 g, a 4 °C hasta volumen constante (aproximadamente 40 min). Las fracciones obtenidas se liofilizaron y conservaron a -20°C hasta su uso.

3.2.2 Concentración peptídica de las fracciones de hidrolizados

La concentración peptídica de las fracciones de hidrolizado se determinaron a partir de la concentración de grupos amino primarios determinada mediante el ensayo espectrofotométrico de OPA (descrito en 3.1.8), usando una curva de calibración de L-leucina como estándar (rango de concentración de L-leucina de 0,4 a 8,5 mM).

3.2.3 Actividad inhibidora de ECA-I

La actividad inhibidora de la ECA de las fracciones de los hidrolizados se determinó usando el ensayo espectrofotométrico de Cushman & Cheung (1971), con algunas modificaciones. Brevemente, se añadieron 20 µL de cada fracción del hidrolizado a 100 µL de solución de sustrato (HHL) 5 mM en buffer fosfato de potasio 0,1 M, pH 8,3 conteniendo 0,3 M de NaCl. Se añadió ECA (5 mU) y la mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 30 min. La reacción se detuvo por el agregado de 100 µL de HCl 1 M. El ácido hipúrico formado se extrajo con acetato de etilo, a 95 °C y se cuantificó a 228 nm utilizando un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Japón). La actividad de cada muestra se ensayó por triplicado y la actividad IECA se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad IECA (\%)} = 100 \times \frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \quad [\text{Ecuación 3}]$$

Donde A es la absorbancia de una solución que contiene ECA pero sin hidrolizado; B es la solución con ECA previamente inactivado sin hidrolizado; C es la absorbancia en presencia de ECA e hidrolizado y D es la absorbancia con ECA previamente inactivado y que contiene hidrolizado.

Para cada fracción se calculó el coeficiente de efectividad de inhibición (CEI) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{CEI} = \frac{\text{Actividad IECA (\%)}}{\text{Concentración peptídica (mM)}} \quad [\text{Ecuación 4}]$$

3.2.4 Determinación del IC₅₀

Las fracciones que presentaron mayor CEI se seleccionaron y se determinó el IC₅₀ (concentración de inhibidor capaz de reducir en 50 % la actividad de ECA). Se ensayó la actividad de ECA en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor. Los valores de IC₅₀ se calcularon por ajuste no lineal (función sigmoidea) de los gráficos de porcentaje de inhibición de ECA (% IECA) en función del log de la concentración de inhibidor utilizando el programa OriginPro 2016 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). La concentración peptídica de las fracciones se determinó como se describió en la sección 3.2.2.

3.2.5 Perfil peptídico

Para realizar el perfil peptídico de los hidrolizados se puso a punto un método de cromatografía de exclusión molecular (SEC). Se utilizó un equipo Prominence UFLC System (Shimadzu, Japón), equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (SPD-M20A). Se utilizó una columna Superdex™ Peptide 10/300 GL (13 μm, 10 x 300 mm, GE Healthcare Life Sciences) a temperatura ambiente. La separación se realizó en condiciones isocráticas usando una solución 30 % (v/v) acetonitrilo (ACN) y 0,1 % (v/v) de ácido trifluoracético (TFA) en agua Milli Q como fase móvil con un flujo de 0,5 mL/min durante 60 min. La detección de los picos del cromatograma se realizó a una longitud de onda de 220 nm.

La columna se calibró utilizando un estándar compuesto por: alfa lactalbumina (14.175 Da), aprotinina (6.512 Da), cadena beta de insulina oxidada (3495,9 Da), angiotensina II (1.046,2 Da), metionina-encefalina: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met (573,7 Da), Gly-Phe (222 Da), Gly-Tyr (238,2 Da) y Gly-Gly (132,12 Da). El análisis de los cromatogramas se realizó utilizando el software LCSolution (Shimadzu, Japón).

3.2.6 Digestión gastrointestinal *in vitro*

Los filtrados de ultrafiltración (Vivaspin 15R, corte 2 kDa) de los hidrolizados de LS, ALA y BLG (fracciones FHLS, FHALA y FHBLG respectivamente) se sometieron a un proceso enzimático en dos etapas con pepsina, y tripsina y quimotripsina, para simular las condiciones en las que se encuentran los péptidos en el organismo antes de ser absorbidos. Las hidrólisis se llevaron a cabo en un baño termostático a 37 °C y agitación constante (220 rpm) (Polystat μPros, Bioblock Scientific, Francia). Las muestras se hidrolizaron primero con pepsina (1:10.000) (Sigma) utilizando una relación enzima:sustrato 1:50 (mg/mg), durante 90 min a 37 °C y pH 2,5. A continuación se hidrolizaron con pancreatina (Sigma) utilizando una relación enzima:sustrato 3:100 (mg/mg), a un pH 7-8 durante 90 min. La reacción se finalizó calentando durante 15 minutos en un baño de agua a 95 °C. El hidrolizado obtenido se centrifugó durante 30 minutos a 5 °C y 35000 x g, y se recogió el sobrenadante. Paralelamente se prepararon controles para cada muestra, en los que se agregó el volumen equivalente de HCl o buffer en lugar de pepsina o pancreatina.

3.3 Purificación de péptidos IECA

3.3.1 Cromatografía de exclusión molecular

3.3.1.1 SEC en Sephadex G-25

La separación se realizó utilizando una columna de 18 x 250 mm empaquetada con Sephadex G-25 de 50 μm (Amersham Pharmacia, Suecia) y equilibrada en una solución de TFA al 0,1 % (v/v) en ACN: agua Milli-Q (30:70) conectada a una bomba peristáltica (Modelo P-3, Pharmacia LKB, Suecia).

El FHLS liofilizado se disolvió en agua Milli-Q a una concentración 6x y se filtró por una membrana de 0,22 μm (acetato de celulosa, Sartorius, Alemania). Se inyectó 0,5 mL de muestra y la corrida se realizó en condiciones isocráticas con un flujo de 0,5 mL/min. Se tomaron fracciones de 0,5 mL y la detección se realizó a 220 nm. De acuerdo al perfil de A 220 nm se formaron «pooles» de fracciones a los cuales se determinó la actividad IECA (sección 3.2.3) y concentración peptídica (sección 3.2.2).

La distribución de masas de las muestras se analizó por SEC-HPLC (sección 3.2.5) y por espectrometría de masas utilizando un equipo 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, USA). Los análisis de espectrometría de masas se realizaron en el Servicio de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (Instituto Pasteur, Montevideo). 1 μL de muestra se mezcló con 1 μL de ácido α -ciano 4-hidroxicinámico en TFA (0,1 %, v/v) en ACN: agua Milli-Q (60:40). El espectro se registró en el modo reflector positivo y se realizó una calibración externa del equipo con el estándar: Mezcla de Calibración 1 (Cal Mix 1, Applied Biosystems, USA). Se realizó la comparación de las masas de los péptidos de cada «pool» con las masas de los péptidos derivados teóricamente de ALA (UniProt: P00711) y BLG (UniProt: P02754) utilizando la herramienta FindPept (<http://web.expasy.org/findpept/>).

3.3.1.2 SEC-HPLC

Se empleó el método descrito en la sección 3.2.5 (equipo, solventes, flujo y columna). Las muestras se filtraron por membranas de 0,22 μm (acetato de celulosa, Sartorius, Alemania). Se inyectó un volumen de 100 μL para el FHLS (4,5 mg/mL), 150 μL para HALA (0,7 mg/mL) y HBLG (1,3 mg/mL) y, 200 μL para el FHALA (0,1 mg/mL) y FHBLG (0,4 mg/mL). Se realizaron tres corridas idénticas de cada muestra para obtener la cantidad de material suficiente. Las fracciones de 1,0 mL de cada corrida se combinaron individualmente (HLS) o formando «pooles» (HALA, FHALA, HBLG y FHBLG) de acuerdo a su perfil de absorbancia a 220 nm. Las fracciones o «pooles» seleccionadas se concentraron por evaporación al vacío hasta eliminar completamente el solvente y se guardaron a -20 °C. Antes de su análisis las muestras evaporadas se disolvieron con agua Milli-Q (en un volumen 20 veces menor).

3.3.2 Extracción en fase sólida del hidrolizado de lactosuero

Se empleó un cartucho C18 Varian Mega Bond Elut 2 g/12 mL (Agilent, USA) acondicionado con 24 mL de la mezcla de ACN: agua Milli-Q (60:40) y equilibrado con 24 mL de TFA (0,1 %, v/v) en agua Milli-Q. Tras la carga de la muestra (12 mL de HLS), se separó la fracción que no fue retenida (NR) y se realizó una etapa de lavado con 24 mL de TFA (0,1 %, v/v) en agua Milli-Q. La elución se realizó en cuatro etapas con TFA (0,1 %, v/v) en ACN: agua Milli-Q: (10:90) para el eluido E1; (30:70) para E2; (60:40) para E3 y (100:0) para E4. Las fracciones de la extracción en fase sólida (SPE) se analizaron por SEC-HPLC como se describe en la sección 3.2.5.

Las fracciones de SPE se concentraron previamente a la realización de los ensayos de actividad IECA y concentración peptídica. La concentración de las muestras se realizó por evaporación completa del solvente en vacío y se redisolución utilizando agua Milli-Q en un volumen 20 veces menor.

3.3.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC)

La separación se realizó utilizando un sistema UFLC Prominence (Shimadzu, Japón) compuesto por: un inyector automático modelo SIL-20AC HT, una bomba modelo LC-20AD, un horno modelo CTO-20AC, un detector de arreglo de diodos modelo SPD-M20A y un módulo controlador modelo CBR-20A. El análisis de los datos se realizó utilizando el software LC Solution (versión 1.25, Shimadzu).

La muestra de HLS se preparó utilizando un cartucho de SPE C18. El HLS se acondicionó utilizando una columna de SPE C₁₈ (Baker Bond SPE octadecyl 200 mg/3mL, JT Baker, EEUU). Se aplicaron 3 mL de HLS a la columna previamente acondicionada, se retiró la fracción no retenida (NR) y se lavó con 9 mL de una solución de TFA 0,1 % (v/v) en agua Milli-Q. La elución se realizó con un total de 4 mL de una solución de ACN 30 % (v/v) en agua Milli-Q. El ACN se eliminó por evaporación y la fracción resultante se filtró a través de una membrana de 0,22 µm (acetato de celulosa, Sartorius, Alemania). Se inyectaron 100 µL de muestra en una columna Viva C18 de 5 µm, 300 Å y dimensiones de 4,6 x 250 mm (Restek, USA). La elución se realizó con un flujo de 1 mL/min utilizando un gradiente binario de TFA en agua Milli-Q (0,1 %, v/v) para el solvente A y TFA en ACN (0,1 %, v/v) para el solvente B. El gradiente usado fue: 0 a 10 min, gradiente lineal de 0 a 10% de B; 10 a 70 min, gradiente lineal de 10 a 30 % de B y de 70 a 80 min, gradiente lineal de 30 a 100 % de B. La cromatografía se realizó a 40 °C y la detección se realizó a 220 nm. Se recogieron fracciones de 0,5 mL que se concentraron por evaporación al vacío utilizando un equipo Savant SPS1010P1-230 SpeedVac (Thermo Scientific, USA). Las muestras evaporadas se disolvieron en 100 µL de agua Milli-Q.

Los FHALA y FHBLG se caracterizaron utilizando el mismo equipo y las mismas condiciones (solventes, flujo y columna) que el HLS. Las muestras liofilizadas se prepararon a una concentración de 30 mg/mL (de sólido) en una solución de TFA en agua Milli-Q (0,05 %, v/v), se filtraron a través de membranas de 0,22 µm (acetato de celulosa, Sartorius, Alemania) y se

inyectaron 100 μL a la columna. El gradiente usado para FHALA fue: de 0 a 50 min, gradiente lineal de 0 a 30 % de B; de 50 a 80 min, gradiente lineal de 30 a 60 % de B; de 80 a 100 min, gradiente lineal de 60 a 100 % de B y de 100 a 105 min 100 % de B. El gradiente usado para FHBLG fue: de 0 a 40 min, gradiente lineal de 0 a 30 % de B; de 40 a 60 min, gradiente lineal de 30 a 60 % de B; de 60 a 70 min, gradiente lineal de 60 a 100 % de B y de 70 a 85 min 100 % de B. Se colectaron fracciones de 1 mL de tres corridas idénticas para cada muestra que se mezclaron antes de eliminar completamente el solvente por evaporación al vacío utilizando un equipo Savant SPS1010P1-230 SpeedVac (Thermo Scientific, USA). Las muestras evaporadas se disolvieron en 100 μL de agua Milli-Q.

3.4 Purificación, identificación y caracterización de péptidos IECA derivados de ALA

3.4.1 Purificación de las peptidasas del extracto crudo de *B. antiacanta*

La purificación del ECBA se llevó a cabo por cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna de 40 x 145 mm empaquetada con SP-Sepharose Fast Flow 90 μm (Amersham Pharmacia, Suecia) equilibrada en buffer citrato de sodio 10 mM, pH 4,5. Se aplicaron 5,0 mL de ECBA (dilución 3/5 de ECBA en el buffer anterior) a la columna y se realizó la adsorción en batch durante 30 min a 4 °C con agitación rotatoria. La fracción no retenida por el intercambiador (NR) se colectó y se realizaron los lavados necesarios de la columna con 2,0 mL del mismo buffer y en las mismas condiciones que la adsorción de la muestra. La elución se realizó haciendo pasar por la columna una solución de NaCl 0,4 M en el buffer anterior a presión atmosférica. Se recolectaron fracciones de 1,0 mL a las cuales se realizó un espectro UV (220-400 nm) utilizando un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Japón). La actividad proteolítica se determinó utilizando el método de azocaseína (sección 3.1.3) y la concentración proteica por el método de Bradford (sección 3.1.4). Los eluidos seleccionados de cromatografías repetidas se mezclaron y concentraron por ultrafiltración utilizando Viva Spin 15R (Sartorius, 2.000 MWCO, Alemania). A este preparado se lo denominó EPBA.

3.4.2 Hidrólisis de ALA

Una solución de ALA (1,3 mg/mL) en buffer borato de sodio 0,1 M, pH 9,2 se hidrolizó utilizando EPBA. La reacción se realizó con una relación enzima sustrato (E/S) de 1,0 UE/mg de ALA durante 30 min a 50 °C. Para detener la reacción el hidrolizado se incubó 15 min a 95 °C y a continuación se centrifugó a 7.000 g durante 15 min a 4 °C. Posteriormente, el hidrolizado de ALA (HALA) se fraccionó por ultrafiltración utilizando VivaSpin 15R (Sartorius, 2.000 MWCO, Alemania). El FHALA (5,0 mL) se concentró utilizando un cartucho Bakerbond speTM Octadecyl C18 (JT Baker, USA). Los péptidos se eluyeron con 1,0 mL de solución 30 % (v/v) de ACN en agua y luego 1,0 mL de una solución 100 % (v/v) de ACN en agua. Los dos eluidos se mezclaron y concentraron por evaporación al vacío utilizando un equipo Savant SPS1010P1-230 SpeedVac (Thermo Scientific, USA). La muestra se redisolvió en una solución de NaCl 0,5 M en buffer fosfato de potasio 0,2 M pH 7,0.

3.4.3 Inmovilización de ECA-I en NHS-Sepharose 4 Fast Flow

Se colocaron 100 μL de agarosa activada con N-hidroxisuccinimida (NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare, Suecia) en una mini columna (PierceTM Spin Columns, Thermo Scientific, USA). La matriz se activó con 1,5 mL de HCl 1 mM (frío) y posteriormente se lavó con 100 μL de una solución de NaCl 0,5 M en buffer fosfato de potasio 0,2 M, pH 7,5 (buffer de inmovilización, dos veces). Inmediatamente se agregaron 200 μL de ECA-I (0,9 mg/mL) en buffer de inmovilización y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Paralelamente, se preparó una columna de control en la que se sustituyó la solución de ECA-I por buffer de inmovilización para

descartar péptidos que se retengan por uniones inespecíficas. La fracción no retenida (sobrenadante) de cada columna se separó por centrifugación a 1.000 g y 4 °C y se realizaron seis lavados con 200 µL de buffer de inmovilización. Los grupos reactivos que no reaccionaron se bloquearon con 200 µL de etanolamina 0,5 M, pH 8,3, 0,5 M NaCl durante dos horas a temperatura ambiente, con agitación por rotación. Finalmente, las columnas se lavaron con 300 µL de una solución de NaCl 0,5 M en buffer acetato de sodio 0,1 M pH 4,5, alternando con una solución de NaCl 0,5 M en buffer Tris HCl 0,1 M, pH 8,5, este paso se repitió tres veces. Las columnas se almacenaron en etanol al 20 % (v/v) en agua. Se determinó el porcentaje de inmovilización en base a la concentración de proteínas determinada por el método de Bradford (sección 3.1.4)

3.4.4 Purificación de los péptidos IECA por cromatografía de afinidad

Se aplicaron 100 µL de FHALA a la columna con ECA-I inmovilizada y a la columna de control, previamente equilibradas en buffer fosfato de potasio 0,2 M pH 7,0, 0,5 M NaCl (buffer de equilibrio). Luego de incubar toda la noche a 4 °C, se separó el no retenido (NR) por centrifugación a 1000 g durante dos min, se lavó con 200 µL buffer de equilibrio (cuatro veces). Los péptidos retenidos se eluyeron con 100 µL de buffer fosfato de potasio 0,2 M pH 7,0, con NaCl al 1,0 M, centrifugando a 1000 g por dos minutos, este paso se repitió tres veces.

3.4.5 Identificación y secuencia de péptidos IECA

Este procedimiento se realizó en el Servicio de Espectrometría de Masas, de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, del Instituto Pasteur de Montevideo. Los eluidos de las columnas, con ECA-I inmovilizada y de control, de la cromatografía de afinidad (sección 3.4.3) se analizaron para identificar los péptidos que se unieron específicamente a la ECA-I inmovilizada. Las muestras (200 µL) se concentraron por evaporación del solvente, se resuspendieron en 15 µL de ácido fórmico 0,1 % (v/v) y se concentraron utilizando tips de microextracción C18 Agilent Bond Elut Omix (Agilent Technologies, USA), se evaporó nuevamente el solvente y se resuspendieron en ácido fórmico 0,1 % (v/v). Las muestras se inyectaron en una columna Poroshell (Agilent Technologies, USA) conectada a un sistema Easy nLC 1000 (Thermo Scientific, USA) acoplado a un espectrometro de masas en tándem con ionización por electrospray (ESI MS/MS LTQ Thermo Scientific, USA). Las secuencias de los péptidos se identificaron utilizando el motor de búsqueda Mascot en modo de búsqueda de ion MS/MS, con tolerancia $\pm 1,5$ Da, en bases de datos públicas y locales (utilizando la secuencia reportada de ALA bovina, UniProtKB - P00711). Los resultados se compararon con los correspondientes a los eluidos de la columna de control para descartar los péptidos que se unieron de forma inespecífica.

3.4.6 Síntesis de péptidos inhibidores de ECA-I

Los péptidos identificados se sintetizaron químicamente por el Servicio de Síntesis de Peptide 2.0 Inc. (Virginia, EEUU). Para confirmar su actividad IECA se determinó su IC₅₀ (sección 3.2.4) y se realizaron los estudios de cinética de inhibición que se describen en la sección 3.4.9.

3.4.7 Análisis de los perfiles de RP-HPLC de los péptidos sintéticos

El FHALA preparado para la cromatografía de afinidad y los péptidos sintéticos derivados de ALA se analizaron utilizando el mismo equipo y condiciones (solventes, flujo, columna y preparación de la muestra) que se describieron en la sección 3.3.3. El gradiente usado fue: de 0 a 60 min, gradiente lineal de 0 a 60 % de B y de 60 a 70 min, gradiente lineal de 60 a 100 % de B.

3.4.8 Caracterización estructural de los péptidos IECA-I identificados

Los parámetros fisicoquímicos teóricos de los péptidos IECA-I identificados se calcularon en la herramienta ProtParam de la plataforma ExPASy (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>).

3.4.9 Caracterización cinética de los péptidos IECA-I identificados

Para los estudios de cinética de inhibición se utilizó el sustrato de ECA-I: N-[3-(2-furil) acrilóil]-L-fenilalanilglicilglicina (FAPGG) que permite la medida de la velocidad de reacción de forma continua (método cinético). La cinética de inhibición de ECA-I se estudió monitoreando espectrofotométricamente la hidrólisis de FAPGG de acuerdo al método de Buttery & Stuart (1993) con algunas modificaciones. Se mezclaron 490 μL de FAPGG (disuelto en buffer borato de sodio 50 mM, pH 8,2, 0,3 M en NaCl) con 10 μL de inhibidor y se preincubó a 37 °C durante cinco minutos. La reacción se inició con el agregado de 10 μL de ECA-I stock y se registró la disminución de la $A_{345\text{nm}}$ cada 0,1 min durante un tiempo total de diez minutos utilizando un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Japón) a 37 °C. La velocidad inicial (v_o) de la hidrólisis de sustrato se calculó utilizando la porción lineal de los gráficos de $A_{345\text{nm}}$ en función del tiempo utilizando la siguiente ecuación:

$$v_o = \frac{\Delta A_{345\text{nm}}/\text{min} \times 1 \text{ cm}}{0,5343 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \quad [\text{Ecuación 5}]$$

Donde:

$$\Delta A_{345\text{nm}}/\text{min} = \text{pendiente}$$

$$0,5343 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} = \text{absortividad de FAPGG (Buttery \& Stuart, 1993)}$$

Se determinó la v_o para concentraciones crecientes de cada uno de los péptidos inhibidores dejando fijas las concentraciones de ECA-I y sustrato. A partir de los gráficos de v_o en función de concentración de inhibidor se estableció el carácter parcial o total de la inhibición y una vez que se estableció el tipo de inhibición se determinó la constante de inhibición (K_i).

Para establecer el tipo de inhibición de los péptidos se determinó la v_o de hidrólisis del sustrato para diferentes concentraciones de sustrato en ausencia de inhibidor y en presencia de diferentes concentraciones de este. Los parámetros cinéticos de ECA-I en la hidrólisis de FAPGG (K_M y V_{Max}) en ausencia de inhibidor y los parámetros cinéticos aparentes en presencia de las

diferentes concentraciones de inhibidor se determinaron a partir del ajuste lineal de los gráficos de $[S]/v_o$ en función $[S]$ (gráficos de Hanes Woolf). Las K_i se calcularon a partir de regresión lineal de los gráficos de $[S]/v_o$ versus concentración de inhibidor (gráficos de Cornish-Bowden). Para los gráficos y los ajustes se utilizó el programa OriginPro 2016 (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Hidrólisis de proteínas de LS con PepBA

Como se detalló en el marco teórico, el LS bovino presenta dos proteínas principales (ALA y BLG) que contienen potenciales secuencias de péptidos IECA que pueden ser liberadas por proteólisis. Comenzamos este trabajo con el estudio de la reacción de hidrólisis de las proteínas de LS con PepBA.

Las peptidasas de PepBA se caracterizaron (Vallés et al., 2007) y se seleccionaron para este trabajo debido a que presentan características adecuadas para la producción de hidrolizados de proteínas de LS. Estas peptidasas tienen una especificidad de corte amplia, semejante a la de papaína, que posibilitaría una extensa degradación de diferentes sustratos. Esto es particularmente importante cuando se busca obtener péptidos IECA, debido a que son de tamaño molecular muy pequeño (menor a 2,0 kDa). PepBA tiene una importante actividad proteolítica que aumenta con la temperatura llegando a su valor máximo a 63 °C y un perfil de actividad amplio en función del pH (pH 5 a 9). De acuerdo a estas propiedades, tanto el pH como la temperatura de reacción pueden ser manejados con flexibilidad para optimizar la reacción de hidrólisis. Estos datos corresponden a una caracterización realizada utilizando caseína como sustrato, y debido a que las proteínas del LS tienen características estructurales diferentes, las mejores condiciones para la hidrólisis pueden diferir. Por este motivo, en primer lugar, se estudió la reacción de hidrólisis de las proteínas del LS con PepBA.

Se evaluó el efecto de diferentes condiciones de reacción (relación enzima/sustrato, temperatura y pH) para lograr la degradación de las proteínas del LS de manera de obtener un hidrolizado rico en péptidos pequeños (menores a 15 residuos de aminoácido). Se evaluó cómo afectaban el pH y la temperatura de reacción en la selectividad de PepBA por ALA y BLG en la hidrólisis del LS con el objetivo de seleccionar las condiciones de hidrólisis que favorecieran la hidrólisis simultánea de ambas proteínas. Se estudió el efecto del pH en la cinética de degradación de ALA y BLG con PepBA para relacionar los efectos estudiados con los parámetros cinéticos de PepBA.

4.1.1 Efecto de las condiciones de reacción en la hidrólisis del LS

El efecto de diferentes factores que afectan la reacción de hidrólisis se evaluaron a través del DH, es decir el porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados respecto al total de enlaces peptídicos del sustrato. A partir del DH, es posible estimar el tamaño promedio de los péptidos del hidrolizado.

4.1.1.1 Efecto de la relación enzima/sustrato

De acuerdo a estudios previos (Vallés et al., 2007), en la zona de pH de alta actividad caseinolítica de PepBA, se destacan pH 6 y 9 como valores de pH en los que la actividad fue máxima. Para evaluar el efecto de la relación enzima/sustrato (E/S) en el DH se seleccionaron los pH 6,0 y 9,2 a una temperatura de reacción de 30° C. Las características del preparado enzimático (viscosidad, solubilidad y concentración) permitieron aumentar la cantidad de enzima hasta una relación E/S máxima de 1,0 UE/mg de proteína sustrato.

Los resultados mostraron que la degradación de las proteínas del LS fue más rápida y más extensa con el aumento de la relación E/S (FIGURA 11). Sin embargo, el comportamiento fue diferente a los dos pH ensayados. Como se puede observar en la FIGURA 11 y de acuerdo al resultado del análisis de varianza (ANOVA), a pH 6,0 las diferencias fueron significativas solamente entre los valores extremos de relación E/S (0,2 y 1,0; FIGURA 11A). Por el contrario, a pH 9,2 el DH fue significativamente diferente para todas las relaciones E/S ensayadas (FIGURA 11B).

Se puede observar que la reacción de hidrólisis a pH 9,2 (FIGURA 11B) alcanzó valores de DH más altos que a pH 6,0 (FIGURA 11A). Los valores máximos de DH se alcanzaron a E/S 1,0 y 120 min de reacción en las dos condiciones de pH. Cuando la reacción ocurrió a pH 6,0 el DH máximo fue del $4,2 \pm 0,3$ % mientras que cuando ocurrió a pH 9,2 el DH máximo fue del $6,2 \pm 0,1$ %. Teniendo en cuenta que la actividad caseinolítica de PepBA es mayor (20 %) a pH 6,0 que a pH 9,2 (Vallés et al., 2007), es posible que la degradación de las proteínas del LS se vea favorecida a pH 9,2 debido a cambios en la estructura de las proteínas de este sustrato. Sobre este aspecto se profundizará más adelante en este capítulo («Efecto del pH»).

Debido a que los péptidos de interés tienen un tamaño menor a diez residuos y los más potentes son di o tripéptidos, es conveniente que el DH sea del orden de 10 % con lo que el tamaño promedio de cadena peptídica será de diez residuos. A partir de los valores de DH calculados fue posible estimar la longitud promedio de cadena peptídica (PCL) aplicando la relación propuesta por Adler-Nissen (1986, citado en Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008), definida como:

$$PCL = \frac{100}{DH (\%)} \text{ [Ecuación 6]}$$

De acuerdo a esto, el largo de cadena peptídica promedio para el hidrolizado realizado a pH 6,0 y 30 °C fue de 25 residuos mientras que para el realizado a pH 9,2 y 30 °C fue de 17 residuos.

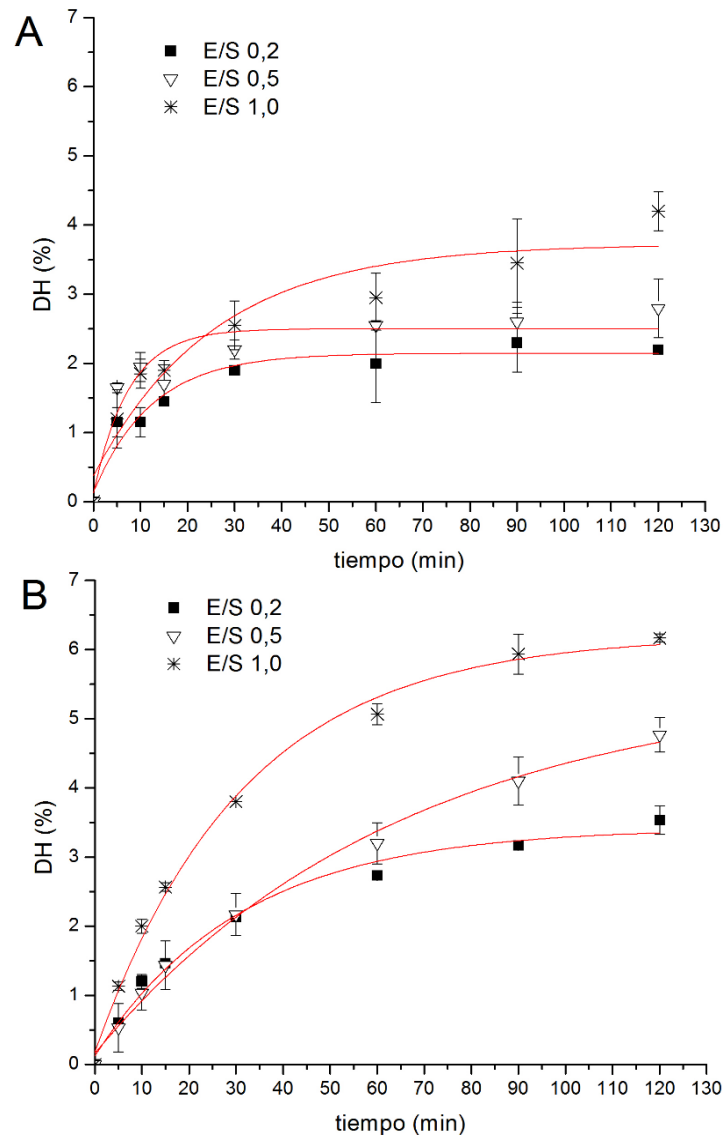


FIGURA 11. Curvas de hidrólisis de LS con PepBA a 30 °C realizadas utilizando diferente relación enzima-sustrato (E/S= 0,2, 0,5 y 1,0 U/mg) a pH 6,0 (A) y a pH 9,2 (B).

4.1.1.2 Efecto de la temperatura

El efecto de la temperatura en el DH de los hidrolizados de LS se estudió a pH 6,0 y pH 9,2 dejando fija la relación E/S en 1,0 UE/mg de proteína. Los resultados mostraron una clara dependencia del proceso de hidrólisis con la temperatura, observándose un gran incremento en la velocidad de reacción y del DH alcanzado cuando la reacción ocurrió a 50 °C tanto para las reacciones a pH 6,0 como a pH 9,2 (FIGURA 12). Además del efecto favorable de la temperatura en la velocidad de catálisis, para la hidrólisis proteica, el aumento de la temperatura puede alterar la estructura del sustrato (aumentando su flexibilidad, exponiendo sitios de corte para la enzima no accesibles en la estructura nativa del sustrato) de forma de volverlo más accesible para la enzima.

Muchas veces la temperatura necesaria para el desplegamiento del sustrato no es compatible con las condiciones de estabilidad de las enzimas y es necesario realizar la desnaturalización

previa del sustrato. En este sentido, resulta un beneficio extra el empleo de un preparado enzimático termoestable y con actividad máxima a alta temperatura, como es el caso de PepBA. La temperatura máxima de hidrólisis utilizada en este estudio fue 50 °C, ya que las proteínas del LS se desnaturalizan a temperaturas mayores a 60 °C conduciendo a la formación irreversible de agregados (deWit & Klarenbeek, 1984) que podrían dificultar la reacción de hidrólisis.

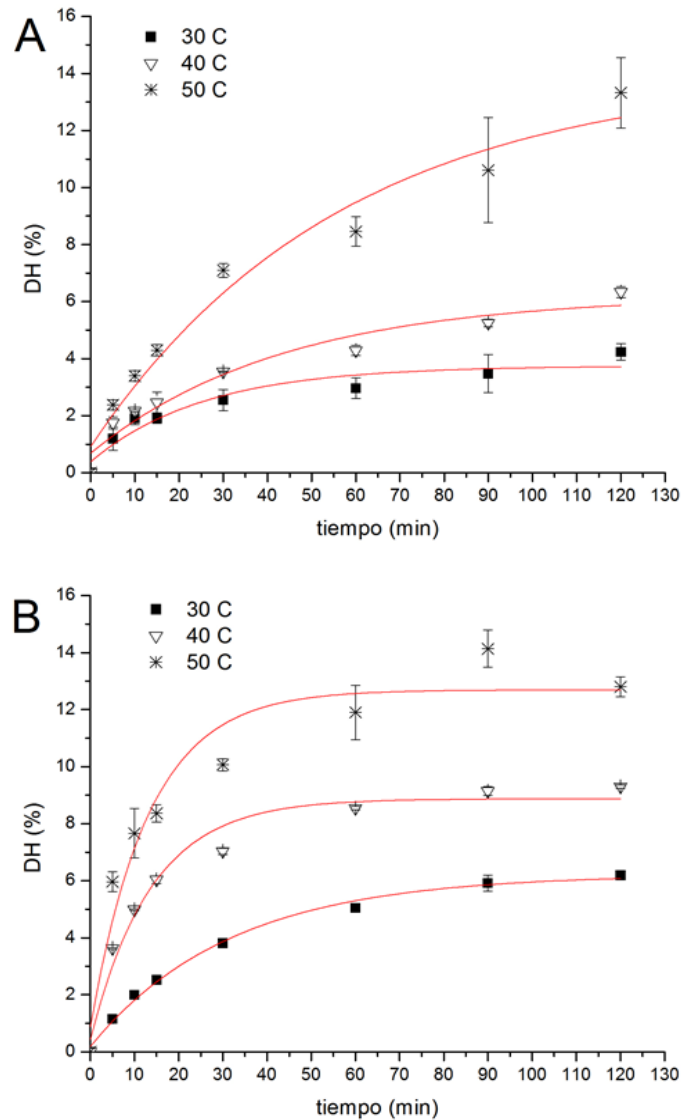


FIGURA 12. Curvas de hidrólisis de LS con PepBA (E/S = 1,0 UE/mg) a diferentes temperaturas (30, 40 y 50 °C) a pH 6,0 (A) y pH 9,2 (B).

Para todas las temperaturas ensayadas se observó que a pH 9,2 la cinética de la reacción de hidrólisis fue más rápida (FIGURA 12B) que a pH 6,0 (FIGURA 12A). Independientemente del pH, cuando la reacción se realizó a 50 °C se llegó a un valor máximo de DH del 12 %. A pH 9,2 este valor de DH se alcanzó a los 60 min de hidrólisis. A temperaturas menores (30 °C y 40 °C), cuando la hidrólisis se realizó a pH 6,0 se alcanzó DH máximos inferiores que a pH 9,2 (DH= 4,2 ± 0,3 y 6,3 ± 0,2 % respectivamente), señalando la importancia de la combinación de estos dos parámetros.

Se ha demostrado que la temperatura de desnaturalización de ALA y BLG varía en función del pH. La desnaturalización de ALA, requiere la disociación del Ca^{2+} la cual ocurre a pH menor a 4,0 o mayor a 9,0 y a temperatura mayor que 50°C (Boye et al., 1997). Para BLG la temperatura de desnaturalización a pH 6,0 es de 80 °C pero disminuye a 57 °C cuando el pH de la solución es 9,0 (Haug, Skar, Vegarud, Langsrud, & Draget, 2009). Teniendo esto en cuenta, la combinación de pH 9,2 y 50 °C favorecería la desnaturalización de las dos proteínas principales del LS. Estas condiciones podrían resultar más favorables para la hidrólisis y explicaría el aumento del DH observado.

El DH máximo de 12 % alcanzado a los 60 min de reacción a pH 9,2 y a los 120 min a pH 6,0, corresponde a un hidrolizado con péptidos de largo de cadena promedio estimado de 8,3 residuos. En estas condiciones, el largo de cadena promedio de los péptidos presentes en el hidrolizado sería menor a 10 residuos, configurando un hidrolizado rico en péptidos de tamaño menor a 1000 Da y una potencial fuente de los péptidos de interés.

4.1.1.3 Efecto del pH

Debido al marcado efecto de la temperatura en la hidrólisis, el efecto del pH se evaluó a 50 °C, la temperatura a la que se registró mayor hidrólisis del LS. Como se puede ver en la FIGURA 13A, las hidrólisis realizadas a pH 6,0; 7,0 y pH 9,2 alcanzaron un valor de DH final cercano al 12 % sin embargo la velocidad de reacción aumentó con el pH (FIGURA 13B). Como se mencionó anteriormente, PepBA presentó una actividad caseinolítica superior a pH 6,0 respecto a pH 9,0 (Vallés et al., 2007). En todas las condiciones ensayadas en este trabajo se obtuvo mayor DH cuando la hidrólisis de LS fue realizada a pH 9,2 respecto a pH 6,0. Teniendo en cuenta que las caseínas son proteínas que carecen de estructuras secundarias bien definidas y se las considera proteínas “desplegadas” (Thorn, Ecroyd, Carver, & Holt, 2015), el efecto del pH en la estructura del sustrato quedaría minimizado. En cambio las proteínas del LS, como ya se explicó anteriormente, presentan una estructura altamente dependiente del pH lo que podría explicar este comportamiento.

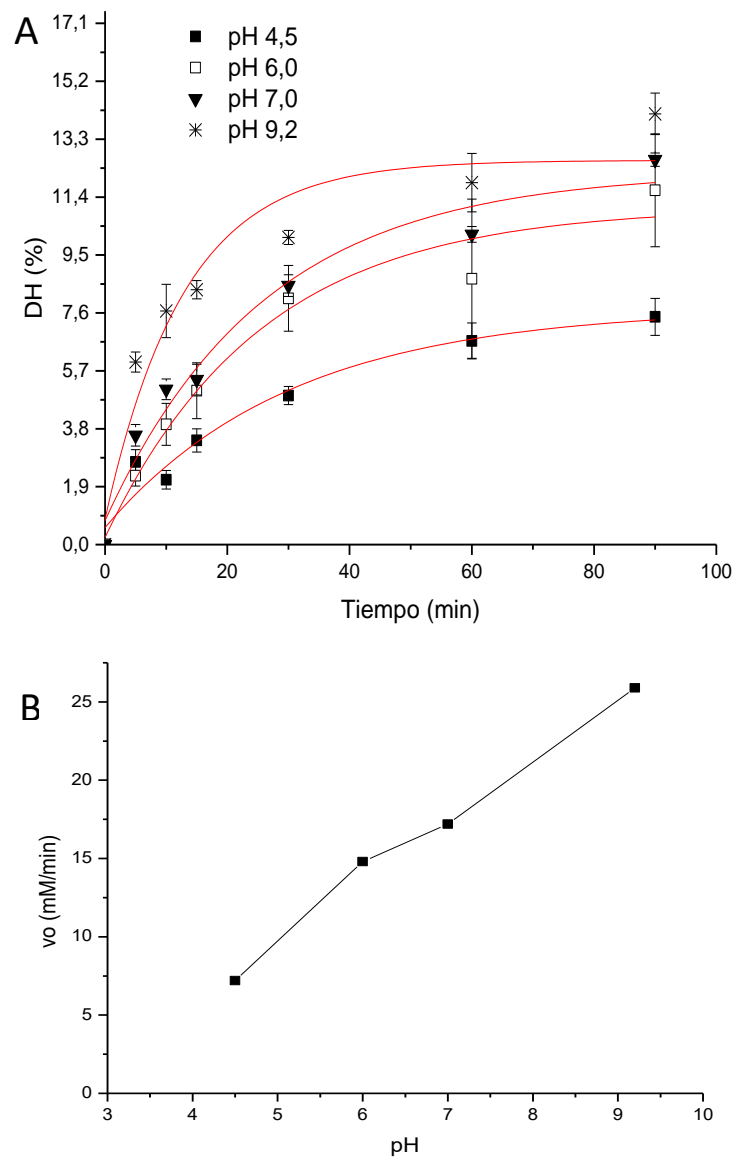


FIGURA 13. Curvas de hidrólisis (A) y de velocidad inicial de hidrólisis (B) para hidrólisis de LS con PepBA (E/S= 1,0 UE/mg) y 50 °C a diferentes valores de pH de reacción.

Un efecto similar, se observó en la hidrólisis de proteínas de LS con tripsina (Cheison, Leeb, Toro-Sierra, & Kulozik, 2011), quimotripsina (Lisak, Toro-Sierra, Kulozik, Božanić, & Cheison, 2013) y proteasa ácida A (Cheison, Bor, Faraj, & Kulozik, 2012). En estos estudios, se observó que el DH aumenta con la temperatura pero, a partir de 50 °C en general disminuye. Esto se explicó por los autores como un aumento de la accesibilidad de los sustratos proteicos debido a que a disminuye su estabilidad y se afecta su estructura facilitando la unión con la enzima. En todos los casos se observó que el pH afectó la velocidad de degradación y selecciona cuál de las proteínas mayoritarias se hidrolizó preferencialmente. Un estudio de optimización de la hidrólisis de las proteínas de LS realizado con actinidina, en el que se evaluó la degradación de ALA y BLG por electroforesis, mostró que el efecto de la temperatura fue altamente dependiente del pH (Vazquez-Lara, Tello-Solis, Gomez-Ruiz, Garcia-Garibay, & Rodriguez-Serrano, 2003).

4.1.2 Efecto del pH y la temperatura en la susceptibilidad a la hidrólisis de las proteínas del LS

El DH es un parámetro que evalúa en forma global el alcance de la reacción de hidrólisis y permite estimar el tamaño promedio de los péptidos del hidrolizado. Mediante electroforesis, es posible evaluar el efecto de las condiciones de reacción en la degradación de cada proteína del LS y observar si ocurre la degradación preferencial de alguna de ellas. A su vez, correlacionando los porcentajes de proteína intacta con el DH, es posible evidenciar las condiciones que ayudan a la desnaturalización de las proteínas sustrato y favorecen su hidrólisis.

4.1.2.1 Efecto del pH en la hidrólisis de ALA y BLG

Se puede observar en la FIGURA 14 que el perfil electroforético de los hidrolizados de LS preparados a 50 °C fue muy diferente según el pH al cual se realizó la reacción de hidrólisis. A pH 4,5 y 6,0 se observó la hidrólisis preferencial de ALA respecto a BLG (FIGURA 14A y B). A pH 6,0 la hidrólisis de ambas proteínas fue más lenta que a pH 4,5. La banda de ALA se redujo casi completamente (quedando menos del 15 % de ALA intacta luego de 60 min de hidrólisis a ambos pHs) mientras que la banda de BLG se redujo parcialmente (BLG intacta= 54 % a pH 6,0 y 21 % a pH 4,5 a los 120 min de hidrólisis). Un efecto similar se observó en la hidrólisis de aislado de proteínas de LS a pH ácido y temperatura mayor a 40 °C con actinidina (Vazquez-Lara et al., 2003) y con cardosina A (Barros & Xavier Malcata, 2004) como se detalla en la TABLA 4.

Cuando la reacción ocurrió a pH 7,0 o 9,2 tanto ALA como BLG se degradaron a niveles semejantes, pero a pH 9,2 la disminución de las bandas de ambas proteínas fue más rápida que para pH 7,0 (FIGURA 14C y 14D). Como se puede observar en la FIGURA 14D, cuando la hidrólisis se realizó a pH 9,2 se produjo la desaparición de las bandas correspondientes a ALA y BLG intactas a partir de los 30 min de reacción. Un comportamiento similar se observó en la hidrólisis de LS realizada con tripsina en condiciones de pH y temperatura «no óptimas» donde se logró la desaparición de ALA y BLG intactas en 10 min de hidrólisis (Cheison et al., 2011). También en hidrolizados de LS con peptidasas de *Bacillus licheniformis* a pH 9,0 y 40 °C se obtuvo la desaparición completa de ALA y BLG intactas en 33 min de hidrólisis (Butré, Sforza, Wierenga, & Gruppen, 2015). Con otras peptidasas vegetales como cardosina A (Barros & Xavier Malcata, 2004) y actinidina (Vazquez-Lara et al., 2003) se obtuvo la degradación preferencial de ALA respecto a BLG a pH ácido (pH 4- 5,7) y temperatura mayor a 40 °C. Los detalles se muestran en la TABLA 4 y se comparan con los resultados obtenidos en este trabajo.

TABLA 4. Hidrólisis de proteínas de LS con diferentes peptidasas y condiciones de reacción.										
Sustrato	Peptidasa	Condiciones «óptimas»		Condiciones de hidrólisis			Proteína remanente		DH (%)	Referencia
		pH	T (°C)	pH	T (°C)	Tiempo (min)	ALA (%)	BLG (%)		
WPI (9,4 %)	Tripsina	7,8	37	8,5	50	5	7,99	0	3,90	(Cheison et al., 2011)
				7,8	37	45	45,03	0	6,94	
				7,8	50	10	0	0	5,69	
WPI (1%)	<i>Bacillus licheniformis</i>	8,0	60	9,0	40	33	0	0	4,5	(Butré et al., 2015)
				8,0	40	45	40	0	4,5	
LS quesería (0,5 %)	Cardosina A	5,7	37	5,2	55	120	0	100	ND	(Barros & Xavier Malcata, 2004)
WPI (0,9 %)	Actinidina	7,3-7,6	60	4,0	41,6	120	10,9	56,9	ND	(Vazquez-Lara et al., 2003)
				5,68	50	120	11,5	75,8	ND	
LS (0,9 %)	PepBA	5-9	63	4,5	50	60	5,1	32,9	6,7	Este trabajo
				9,2	50	15	10,4	3,5	8,4	
				9,2	50	30	3,7	0	10,1	
				9,2	50	120	0	0	13,0	

WPI= aislado de proteínas de LS; ND= no determinado. La concentración de los sustratos está expresada como porcentaje de proteína total (p/v).

En todos los trabajos resumidos en la TABLA 4 se utilizaron condiciones de pH/temperatura de hidrólisis diferentes a las consideradas «óptimas» para la peptidasa PepBA, obteniéndose un menor porcentaje de ALA o BLG intacta cuando las condiciones favorecen la desnaturalización de cada sustrato.

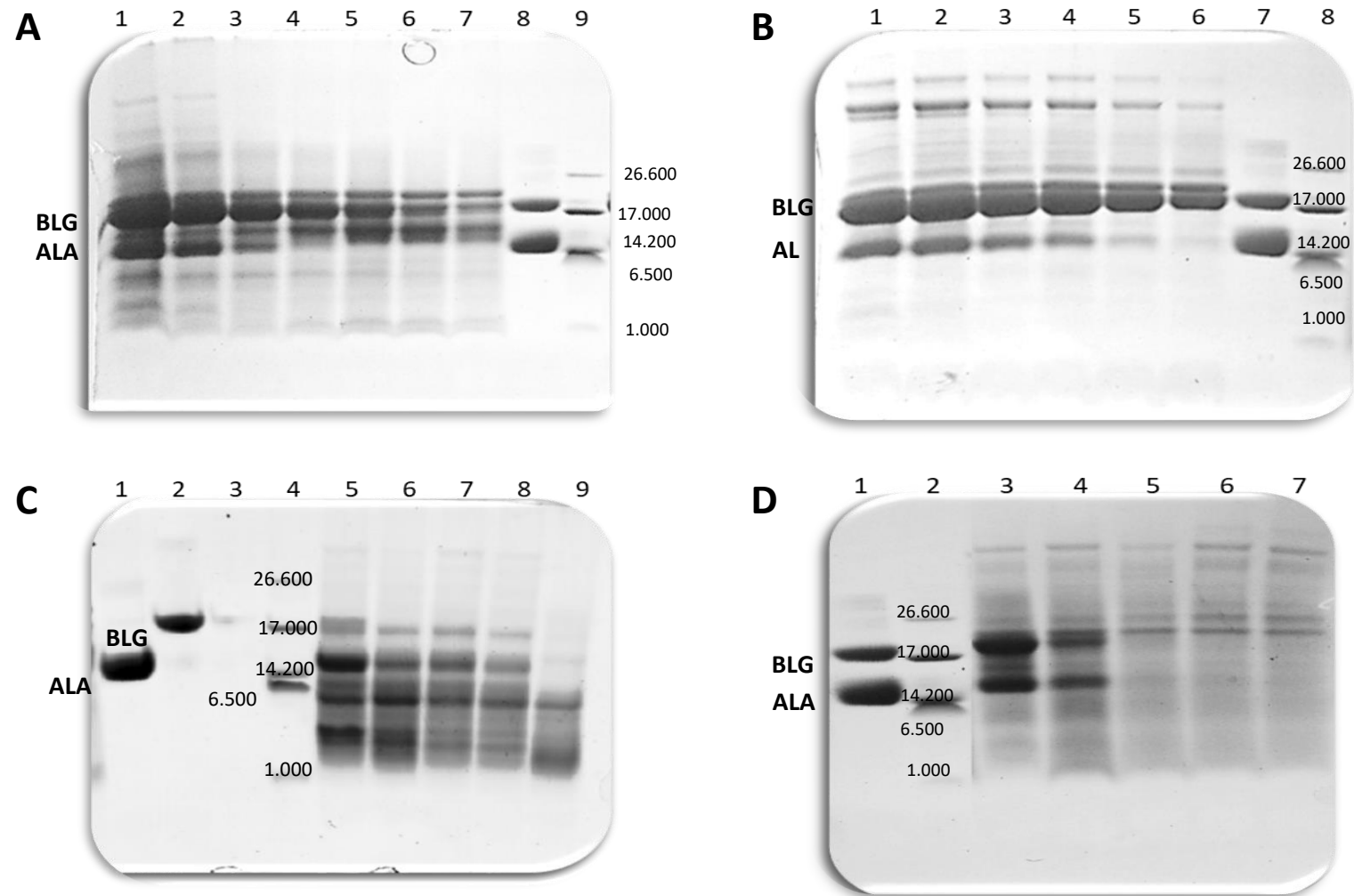


FIGURA 14. Tricine-SDS PAGE de hidrolizados de LS tomados a diferentes tiempos de reacción a E/S 1 y 50 °C. A: Hidrolizado a pH 4,5 durante 0, 5, 15, 30, 60 y 120 min (carriles 1-6); estándar ALA y BLG (carril 7); marcador de masa molecular (MWM, carril 8). B: Hidrolizado pH 6,0 durante 0, 5, 15, 30, 60 y 120 min (carriles 1-6); estándar ALA y BLG (carril 7); MWM (carril 8). C: estándar ALA (carril 1); estándar BLG (carril 2); libre (carril 3); marcador MWM (carril 4); hidrolizado a pH 7,0 durante 0, 5 15, 30 y 120 min (carriles 5-9). D: Estándar ALA y BLG (carril 1); MWM (carril 2); hidrolizado a pH 9,2 durante 0, 5, 15, 30 y 120 min (carriles 3-7).

Más allá del conocido efecto de las condiciones del medio en la actividad de las enzimas, en el caso de las peptidasas, las condiciones también afectan el acceso a los sitios de corte y modifican la flexibilidad de la estructura del sustrato. Para que el sustrato se adapte a la estereoquímica del sitio activo y forme el estado de transición que finalmente conducirá al clivaje del enlace peptídico, la cadena polipeptídica local del sustrato normalmente sufre un desplegamiento de hasta 12 residuos. Generalmente, esto es muy difícil en las proteínas globulares lo que explica su resistencia a la proteólisis en su estructura nativa. De todas formas, existen porciones de la estructura de las proteínas globulares, conocidos como sitios de proteólisis limitada, que presentan una estructura más flexible permitiendo el clivaje (Fontana et al., 2004). Cuando la velocidad de desnaturalización del sustrato es más lenta que la velocidad de hidrólisis del enlace peptídico, cada molécula de sustrato se hidrolizará hasta obtener los productos finales (se clivarán todos los enlaces peptídicos posibles del sustrato). Este mecanismo de hidrólisis se conoce como mecanismo de «uno a uno». En el otro extremo, cuando la proteína sustrato tiene una velocidad de desnaturalización rápida, la enzima la degradará rápidamente a productos intermedios que posteriormente serán degradados hasta los productos finales (mecanismo «de cremallera»).

En el caso particular de las proteínas del LS existe evidencia de su resistencia a la hidrólisis en condiciones nativas debido a su estructura globular poco flexible (O'Mahony & Fox, 2013).

Comparando como cambia el porcentaje de proteína intacta en función del DH, se puede tener una primera aproximación al conocimiento del mecanismo de hidrólisis. A su vez, podemos evaluar si el mecanismo de hidrólisis de ALA y BLG cambia dependiendo del pH al cual se preparó el hidrolizado.

Variación de proteína intacta vs DH a pH 4,5

Cuando la hidrólisis se realizó a pH 4,5, PePBA degradó preferencialmente a ALA respecto a BLG y a los péptidos intermedios producto de la hidrólisis de las proteínas intactas. Esto se hizo evidente debido a la rápida disminución de ALA intacta con el aumento del DH, hasta llegar a la desaparición completa de ALA intacta cuando el hidrolizado presentó un DH de 7 % (FIGURA 15A). En cambio, la variación de BLG intacta con el DH fue más gradual y parcial, quedando 20 % de BLG intacta en el hidrolizado. Debido a que la actividad caseinolítica de PepBA a este pH es baja, es posible que este comportamiento se deba a que ALA presenta una estructura más susceptible a la hidrólisis en esas condiciones. ALA presenta cambios estructurales en función del pH y a pH 4,5 se encuentra en una estructura conocida como «molten globule», una conformación de ALA que facilitaría su degradación por PepBA. En estas condiciones ALA podría degradarse siguiendo un mecanismo mixto que se ha denominado mecanismo «semi cremallera» (Adje et al., 2013) debido a que el sustrato se encuentra en una conformación en la que se mantienen los elementos de estructura secundaria pero la estructura terciaria es mucho menos rígida facilitando la adaptación al sitio activo y su clivaje.

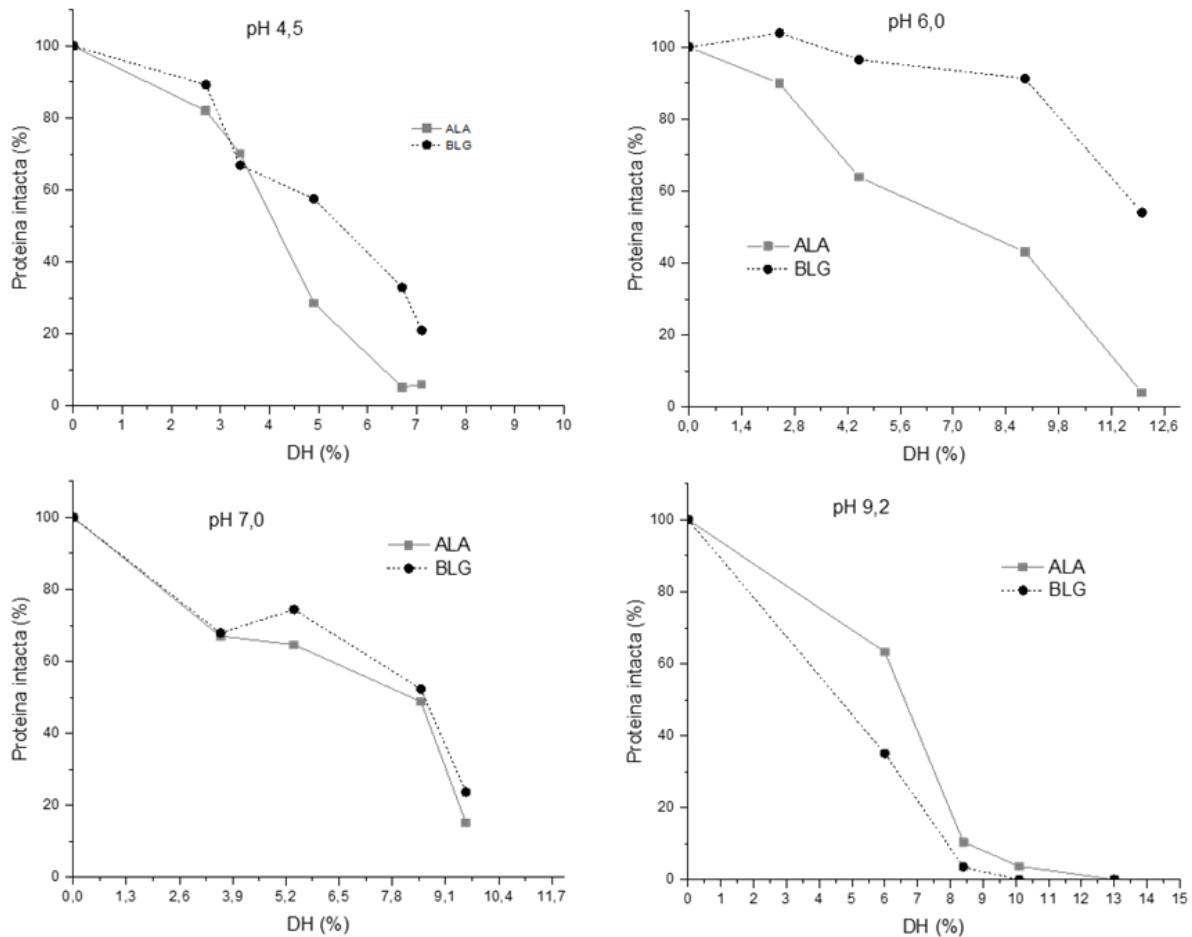


FIGURA 15. Variación de los porcentajes de ALA y BLG intacta en función del DH (%) para las reacciones de hidrólisis de LS a 50 °C y pH 4,5 (A); pH 6,0 (B) ; pH 7,0 (C) y pH 9,2 (D).

Variación de proteína intacta vs DH a pH 6,0

Los resultados correspondientes a la hidrólisis de LS realizada a pH 6,0 mostraron una hidrólisis preferencial de los péptidos intermedios respecto a las proteínas intactas (FIGURA 15B). En comparación con lo que ocurrió a pH 4,5 se registraron valores de DH más altos pero la proteína intacta disminuyó más lentamente. En el caso de ALA se logró la desaparición de la proteína intacta mientras que para BLG esta solo se redujo un 50 % para el hidrolizado de LS con un DH final del 12 %. Los resultados sugirieron que PepBA tiene menor acceso a las proteínas intactas del LS en estas condiciones probablemente debido a que las proteínas del LS se encuentran en una estructura menos favorable para ser digeridas. En estas condiciones la hidrólisis de ALA respecto a BLG fue más favorable. BLG fue difícil de hidrolizar probablemente debido a la estructura o estado de agregación que presenta a pH 6,0. En estas condiciones es posible que el mecanismo de hidrólisis predominante fuese el «uno a uno». Debido a que existiría una muy baja concentración de moléculas de ALA desnaturalizadas, susceptibles a ser hidrolizadas, las moléculas de sustrato se hidrolizarían hasta obtener los productos finales, no se observaron péptidos intermedios y una fracción de la proteína quedó intacta.

Para evaluar si los resultados obtenidos a pH 6,0 pueden atribuirse a una estructura de las proteínas de LS menos accesible se realizaron hidrólisis de LS a pH 6,0 en condiciones desnaturizantes (en presencia de SDS 3,0 %). Como se puede observar en la FIGURA 16, tanto el DH como el perfil electroforético cambian notoriamente cuando la hidrólisis se realizó en presencia de SDS. El DH se duplica (FIGURA 16A) y las bandas correspondientes a ALA y BLG desaparecen completamente (FIGURA 16B) en el hidrolizado preparado en condiciones desnaturizantes en comparación con el LS nativo. Esto podría explicar las diferencias en el comportamiento de la actividad en función al pH observado para PepBA cuando el sustrato es caseína o LS.

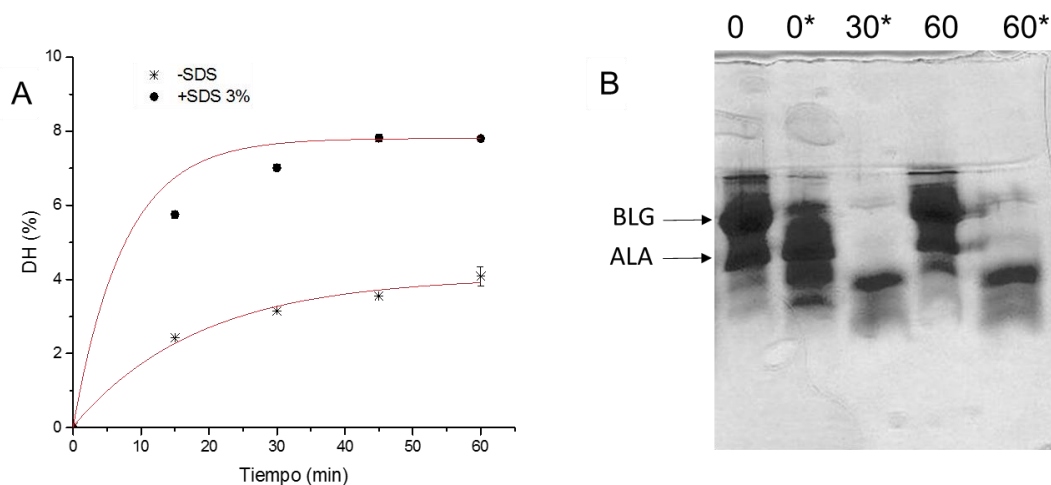


FIGURA 16. (A) Evolución del DH en función del tiempo de reacción del hidrolizado de LS preparado a pH 6,0, E/S= 0,5 y 50 °C; en ausencia de SDS (-SDS) y en presencia de SDS 3% (p/v). (B) Tricine SDS-PAGE de alícuotas de hidrolizados de LS en ausencia de SDS tomadas a tiempo 0 y 60 min, y en presencia de SDS 3% (p/v) tomadas a tiempo 0*, 30* y 60*min.

Variación de proteína intacta vs DH a pH 7,0

Cuando la hidrólisis se realizó a pH 7,0 se observó un comportamiento similar para ambas proteínas. La disminución de proteína intacta con el aumento del DH, fue lenta. Quedando el 20 % de ALA y BLG intacta en el hidrolizado con DH de 9 %. Los hidrolizados a pH 7,0 mostraron una degradación parcial tanto de ALA como de BLG (FIGURA 15C). Este comportamiento podría indicar un mecanismo de «uno a uno», donde la proteína intacta decae lentamente con el aumento del DH debido a que los péptidos intermedios son preferidos por la peptidasa debido a la dificultad de clivar a la proteína intacta.

Variación de proteína intacta vs DH a pH 9,2

Los resultados de la hidrólisis a pH 9,2 mostraron la desaparición total de la proteína intacta tanto para ALA como BLG (FIGURA 15D), siendo esta última degradada más rápidamente que la primera. Cuando se alcanzó un DH del 8% quedaba el 10 % de ALA intacta y 0 % de BLG intacta (Figura 15D) indicando que en estas condiciones se favoreció la degradación de las proteínas intactas. A pesar de esto también se observó la degradación de los péptidos intermedios debido a que el DH

continuó aumentando luego de la desaparición de las bandas de ALA y BLG intactas. La desaparición de BLG intacta se logró cuando el DH fue del 10 % mientras que para ALA esto ocurrió cuando el DH fue del 14 %. A este pH ambas proteínas presentaron una estructura que favoreció su degradación y el mecanismo de hidrólisis predominante podría ser el «de cremallera» o «semi-cremallera».

Las proteínas mayoritarias de LS sufren cambios estructurales, en función de las propiedades del medio, que pueden afectar su susceptibilidad a la hidrólisis. B-LG presenta diferentes estados de asociación molecular en función del pH. A baja temperatura y pH menor a 3,5 se encuentra en forma monomérica estable, en el rango de pH de 3,7 a 5,1 se forman agregados de dos moléculas, estos dímeros a su vez se asocian en el rango de pH 5,1 a 7,5 formando octámeros y a pH superior a 7,5 los octámeros se disocian a monómeros. A temperatura mayor a 40 °C los dímeros se disocian a monómeros. También se ha establecido que la ALA bovina sufre una transición a un estado más desordenado a pH 8,5 (Redington, Breydo, Almehdar, Redwan, & Uversky, 2016) que favorece su desnaturalización y facilitaría la degradación de la proteína intacta.

4.1.2.2 Efecto de la temperatura en la hidrólisis de ALA y BLG

Se evaluó el efecto de la temperatura en la susceptibilidad a la hidrólisis de las proteínas del LS a pH 9,2 por ser el pH en el que se obtuvo la digestión simultánea de las dos proteínas mayoritarias del LS a 50 °C. El aumento de la temperatura de hidrólisis causó el incremento del DH como se indicó en la sección 3.1.1.2 y como se puede ver en la FIGURA 17 además favoreció la degradación de ALA y BLG. Los resultados mostrados revelaron que fue necesaria la combinación de pH 9,2 y 50 °C para lograr la degradación casi completa de ALA intacta (FIGURA 17C), mientras que la desaparición de BLG intacta ya fue lograda a los 40 °C (FIGURA 17B).

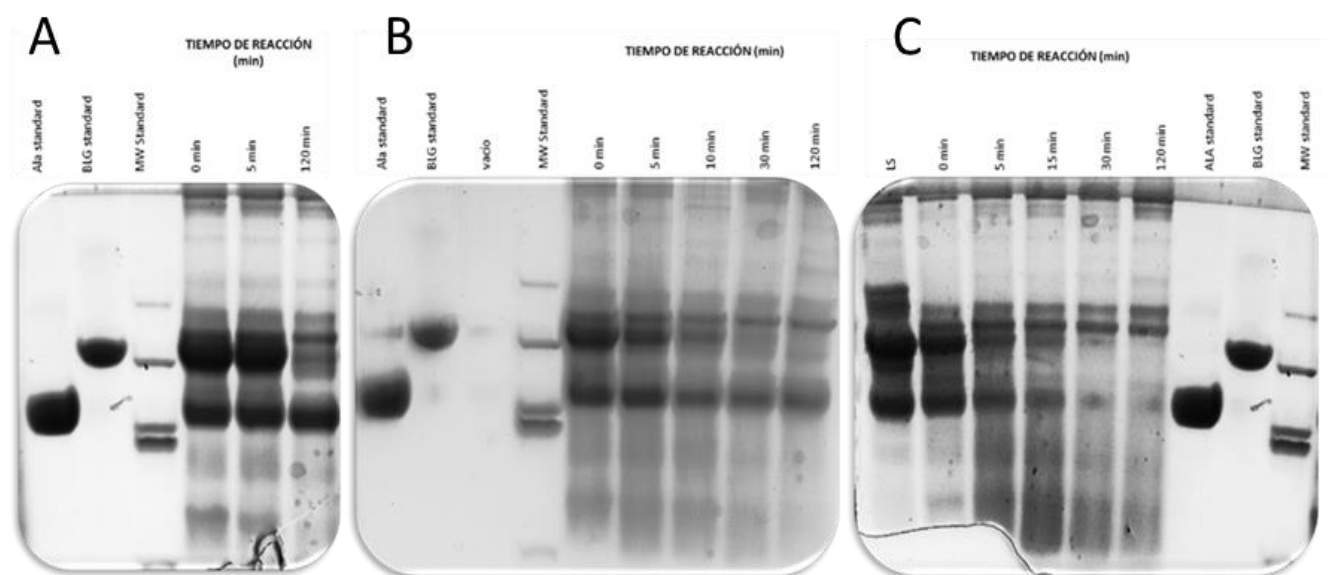


FIGURA 17. Tricine-SDS PAGE alícuotas tomados a diferentes tiempos de reacción de hidrolizados de LS a E/S= 1 y pH 9,2 preparados a diferentes temperaturas; (A) 30 °C (B) 40 °C y (C) 50 °C.

A 37 °C, ALA y BLG son resistentes a la hidrólisis por actinidina (pH 5,5; 7,0 y 8,5) y papaína (pH 7,0) aunque la caseína se hidrolizó en esas mismas condiciones (Chalabi, Khademi, Yarani, & Mostafaie, 2014). Lieske & Konrad (1996), demostraron que al hidrolizar un aislado de proteínas de LS con papaína a 43 °C se obtienen diferentes resultados dependiendo del pH. A pH 3,5 se logra la hidrólisis total de ALA, mientras que a pH 8,0 la degradación de BLG es total y sin embargo cuando la reacción ocurre a pH 6,0 se obtiene una degradación parcial de ambas proteínas.

La degradación de BLG a pH 9,2 fue más extensa comparada con ALA a las tres temperaturas ensayadas. La variación del porcentaje de BLG intacta en función del DH mostró una rápida caída sugiriendo que BLG presentó una estructura sensible a la degradación proteolítica (FIGURA 18) que podría seguir un mecanismo de cremallera, especialmente a 50 °C (FIGURA 18C). Para ALA la variación de proteína intacta en función del DH cambió francamente con la temperatura. Cuando la hidrólisis del LS se realizó a 30 °C ALA fue resistente a la hidrólisis (FIGURA 18 A), mientras que a 40 °C se registró una leve disminución de ALA intacta con el aumento del DH (FIGURA 18B) indicando la dificultad para su hidrólisis a esa temperatura y sugiriendo un mecanismo de «de uno a uno». Cuando la hidrólisis de LS se realizó combinando pH 9,2 y 50 °C la desaparición de ambas proteínas intactas fue completa y cayó rápidamente con el aumento del DH como ya se explicó en la sección 4.1.2.1.

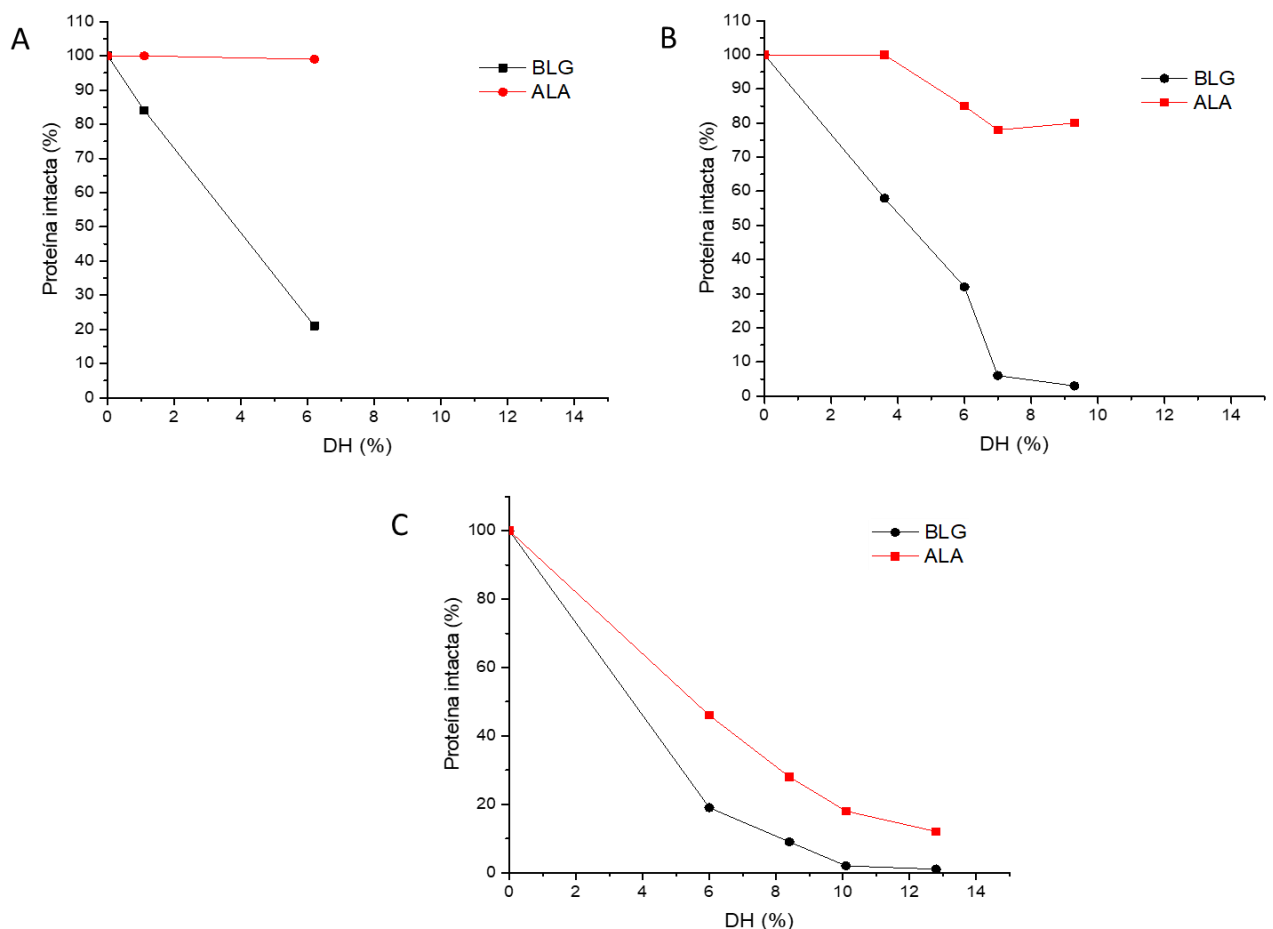


FIGURA 18. Proporción de proteína ALA y BLG intactas en función del DH para las reacciones de hidrólisis a pH 9,2 y temperatura 30 °C (A); 40 °C (B) y 50 °C (C).

4.1.3 Cinética de degradación de ALA y BLG aisladas

Como se analizó en la sección anterior, la efectividad de hidrólisis de las proteínas del LS con PepBA a 50 °C fue evidente y dependiente del pH de reacción. Para analizar el efecto del pH en la cinética de hidrólisis de las proteínas mayoritarias del LS, se determinaron los parámetros cinéticos de PepBA para las hidrólisis de ALA y BLG aisladas. Se seleccionaron tres valores de pH (pH 4,5; 7,5 y 9,2) en los cuales se sabe que cambia el estado de asociación y/o estructura de ALA y BLG. Paralelamente se realizaron los mismos estudios con papaína, la enzima modelo de la familia C1A de peptidasas cisteínicas, con el fin de comparar los resultados obtenidos.

Como se puede apreciar en la FIGURA 19 Y 20 los gráficos de velocidad inicial en función de la concentración de sustrato (ALA y BLG respectivamente) se ajustaron a una hipérbola confirmando una cinética de Michaelis y Menten. A partir del ajuste de los gráficos a la ecuación de Michaelis y Menten (se muestran en el Apéndice 1) se calcularon los parámetros cinéticos aparentes de PepBA y papaína para la hidrólisis de ALA y BLG a los pH ensayados (TABLA 5).

4.1.3.1 Degradación de ALA

ALA se hidrolizó por ambas enzimas a los tres pH ensayados (FIGURA 19). PepBA (FIGURA 19A) mostró un comportamiento cinético dependiente del pH a diferencia de lo observado para la papaína (FIGURA 19B).

PepBA fue más eficiente en la degradación de ALA cuando la reacción ocurrió a pH 4,5 y 9,2 ya que presentó los valores de $(k_{cat}/K_M)_{ap}$ más altos (TABLA 5). En la reacción a pH 4,5 la eficiencia fue elevada debido al bajo valor de $K_{M\ ap}$ indicando una mayor afinidad de PepBA por ALA a ese pH. Este hecho aportó otro elemento para pensar que a pH 4,5 ALA fue más accesible para la unión al sitio activo debido a su estructura a pH ácido. En cambio, la eficiencia elevada a pH 9,2 se debió al aumento de $k_{cat\ ap}$ indicando una mayor velocidad de reacción de hidrólisis. Esto es coherente con el hecho de que los grupos tiol presentan una mayor reactividad a pH alcalino que favorecería el ataque nucleofílico del ion tiolato de la cisteína catalítica al carbonilo del enlace peptídico de acuerdo al mecanismo de las peptidasas cisteínicas.

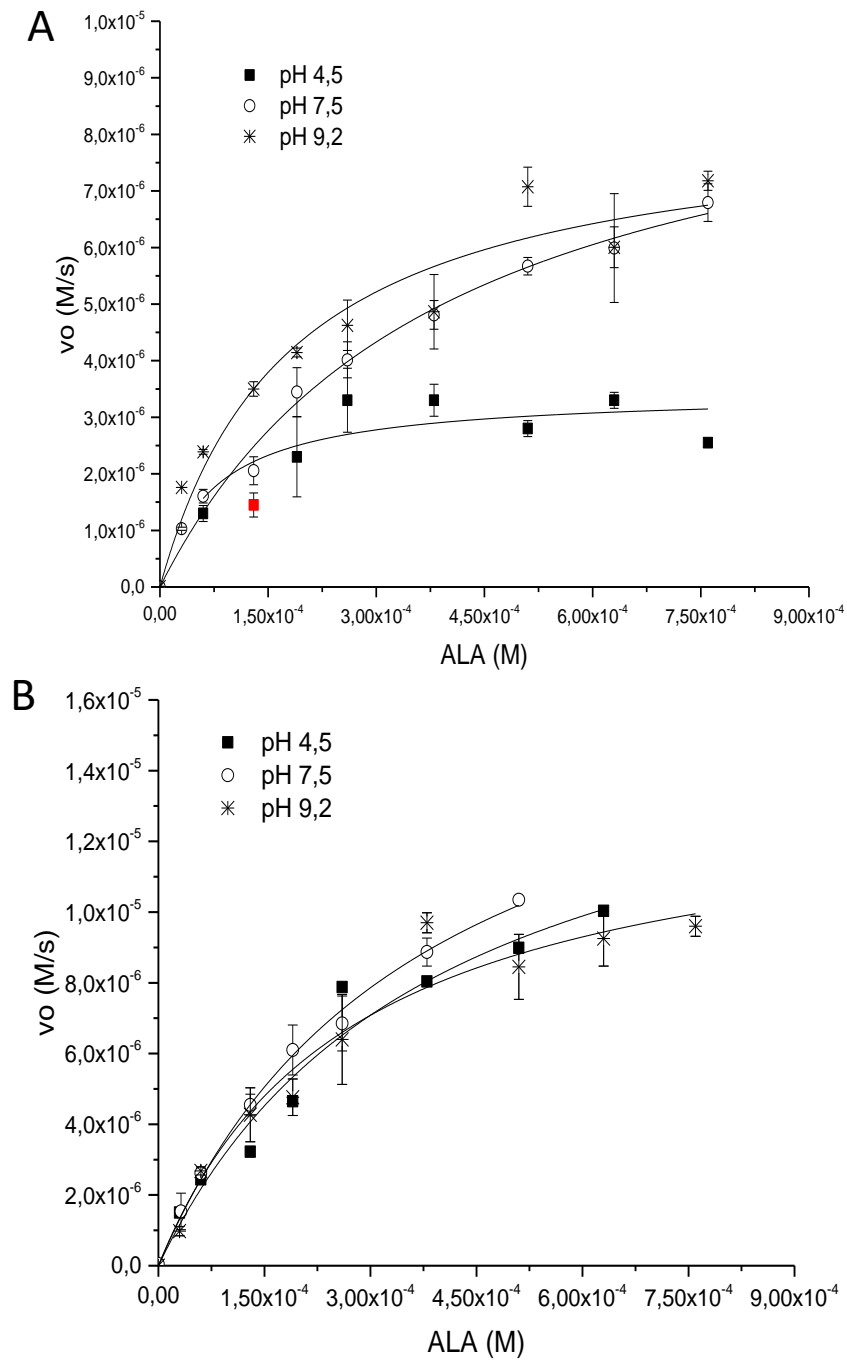


FIGURA 19. Cinética de degradación de ALA a 50 °C y diferente pH de reacción con (A) PepBA y (B) papaína.

TABLA 5. Parámetros cinéticos aparentes de PepBA y papaína para la hidrólisis de ALA y BLG a diferentes pH y 50 °C.

Sustrato	Enzima	pH	$K_{M\ ap}$ (M)	$K_{cat\ ap}$ (s^{-1})	$(k_{cat}/K_M)_{ap}$ ($s^{-1}\ M^{-1}$)
ALA	PepBA	4,5	$(7,21 \pm 4,08) \times 10^{-5}$	$0,95 \pm 0,11$	$(2,06 \pm 1,31) \times 10^4$
		7,5	$(2,10 \pm 0,22) \times 10^{-4}$	$2,01 \pm 0,13$	$(9,75 \pm 1,65) \times 10^3$
		9,2	$(1,78 \pm 0,42) \times 10^{-4}$	$2,17 \pm 0,18$	$(1,32 \pm 0,42) \times 10^4$
ALA	Papaína	4,5	$(3,93 \pm 1,21) \times 10^{-4}$	$1,38 \pm 0,22$	$(4,05 \pm 1,80) \times 10^3$
		7,5	$(3,53 \pm 0,20) \times 10^{-4}$	$1,07 \pm 0,03$	$(3,04 \pm 0,24) \times 10^3$
		9,2	$(2,73 \pm 0,75) \times 10^{-4}$	$1,14 \pm 0,13$	$(4,64 \pm 1,74) \times 10^3$
BLG	PepBA	7,5	$(3,64 \pm 1,56) \times 10^{-4}$	$1,97 \pm 0,53$	$(7,40 \pm 4,63) \times 10^3$
		9,2	$(3,43 \pm 0,64) \times 10^{-4}$	$5,39 \pm 0,49$	$(1,66 \pm 0,45) \times 10^4$
BLG	Papaína	7,5	$(3,06 \pm 0,68) \times 10^{-4}$	$0,88 \pm 0,09$	$(3,09 \pm 0,99) \times 10^3$
		9,2	$(2,78 \pm 0,29) \times 10^{-4}$	$1,13 \pm 0,08$	$(4,16 \pm 0,72) \times 10^3$

4.1.3.2 Degradación de BLG

No se detectaron velocidades de degradación apreciables de BLG a pH 4,5 con ninguna de las dos peptidasas ensayadas mostrando una clara diferencia respecto a la hidrólisis de ALA (datos no mostrados). Para ambas enzimas la degradación de BLG es más rápida a pH 9,2 respecto a pH 7,5 (FIGURA 20). Como se describió en el marco teórico, BLG sufre cambios de estado de agregación en función del pH y la temperatura. En el rango de pH comprendido entre pH 3,5 y 5,1 la formación de octámeros de BLG se ve favorecida. Esto podría explicar el hecho de que, ninguna de las dos peptidasas ensayadas tenga una velocidad de degradación de BLG detectable a pH 4,5.

La afinidad de PepBA y papaína por BLG fue comparable cuando la reacción ocurrió a pH 7,5 y a pH 9,2. La constante catalítica de ambas peptidasas aumentó a pH 9,2 respecto a pH 7,5 como ocurrió en la hidrólisis de ALA (TABLA 5).

Las concentraciones típicas de ALA y BLG en el LS son 1,3 mg/mL ($9,0 \times 10^{-5}$ M) y 3,3 mg/mL ($1,8 \times 10^{-4}$ M) respectivamente. De acuerdo a los valores de $K_{M\ ap}$ determinados se observa que, independientemente del pH de reacción, las concentraciones normales de ALA y BLG en el LS no son concentraciones de saturación para PepBA ni para papaína. En consecuencia, si se quisiera trabajar en condiciones de V_{MAX} deberíamos trabajar con concentrados de LS.

La eficiencia catalítica de PepBA, evaluada con el parámetro $k_{Cat\ ap}/K_{M\ ap}$, fue mayor a pH 9,2 para ambos sustratos. Esto es muy importante cuando se quiere hidrolizar LS ya que se lograría la hidrólisis eficiente de ALA y BLG al mismo pH. Para papaína ocurrió lo mismo, pero la eficiencia de hidrólisis de ALA y BLG fue menor en comparación a la registrada para PepBA.

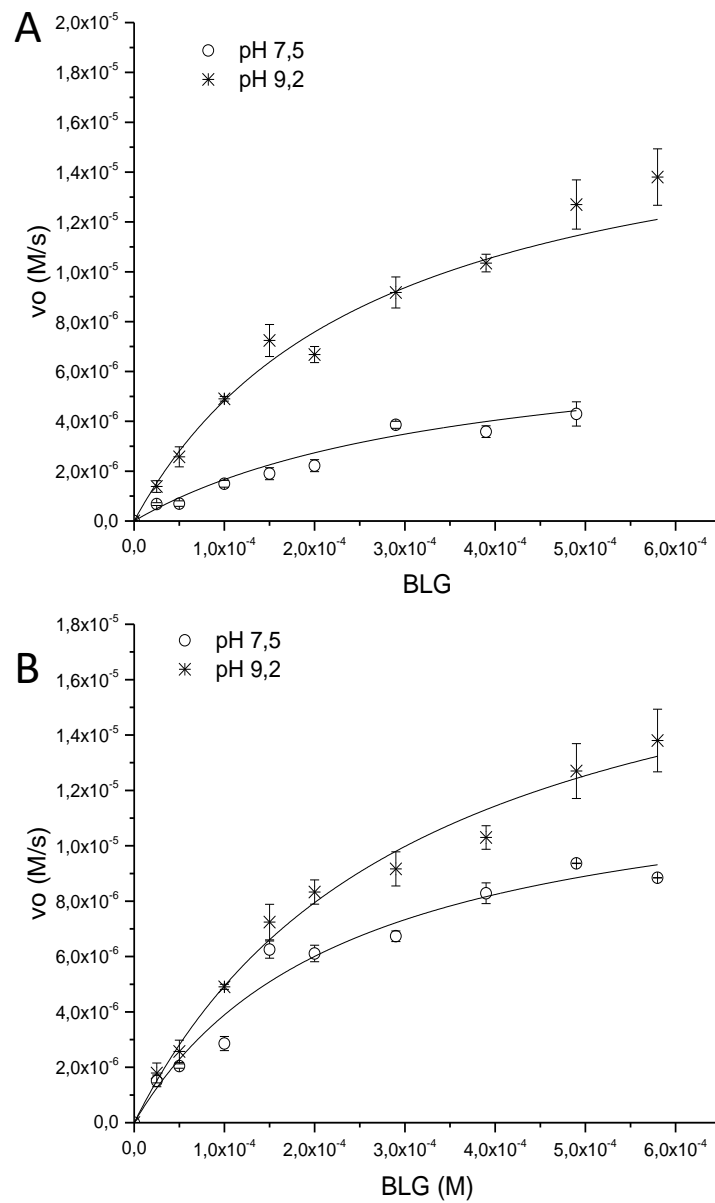


FIGURA 20. Cinética de degradación de BLG a 50 °C y diferente pH de reacción con (A) PepBA y (B) papaína.

No se han reportado muchos estudios de cinética de degradación de proteínas con peptidasas de plantas. En la TABLA 6, se resumen algunos valores de parámetros cinéticos de peptidasas de plantas publicados.

TABLA 6. Parámetros cinéticos para la hidrólisis sustratos proteicos con peptidasas de plantas obtenidas en otros estudios.							
Peptidasa	Sustrato	T (°C)	pH	K_M (M)	K_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$)	Referencia
Papaína	Caseína	25	7,5	$6,2 \times 10^{-7}$	$4,5 \times 10^{-6}$	$2,6 \times 10^4$	(Homaei, Sajedi, Sariri, Seyfzadeh, & Stevanato, 2010)
Bromelaína de tallo	Caseína	25	7,0	$1,3 \times 10^{-4}$	11,7	$9,0 \times 10^4$	(Ahmad, Shamim, Haq, & Khan, 2007)
	Caseína	40	8,0	$5,3 \times 10^{-3}$	10,0	$1,9 \times 10^3$	(Xue et al., 2010)
Actinidina	α Caseína	55	7,2	$1,1 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-1}$	$1,4 \times 10^3$	(Lo Piero, Puglisi, & Petrone, 2011)
	β Caseína	55	7,2	$1,5 \times 10^{-4}$	1,3	$8,5 \times 10^3$	
	κ Caseína	55	7,2	$1,3 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-1}$	$9,2 \times 10^1$	
Cardosina A + B*	κ Caseína	30	6,4	$1,6 \times 10^{-7}$	1,0	$6,5 \times 10^6$	(Queiroz, Faro, & Pires, 1993)
Cardosina A**	ALA	55	5,2	$3,9 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-1}$	$2,6 \times 10^3$	(Barros & Malcata, 2002)
	ALA	55	6,0	$8,0 \times 10^{-6}$	$6,0 \times 10^{-3}$	$7,5 \times 10^2$	
	BLG	55	5,2	$3,1 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-3}$	6,0	
	BLG	55	6,0	$7,3 \times 10^{-4}$	0	0	
Cardosina B**	ALA	55	5,2	$3,8 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^2$	(Barros & Malcata, 2002)
	ALA	55	6,0	$2,0 \times 10^{-5}$	$8,4 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^3$	
	BLG	55	5,2	$3,1 \times 10^{-4}$	$7,0 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^1$	
	BLG	55	6,0	$4,7 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-3}$	$6,4 \times 10^1$	

Comparando los datos mostrados en la TABLA 6 con los resultados obtenidos para PepBA (TABLA 5), se puede observar que los parámetros cinéticos son en general mejores cuando el sustrato es caseína, especialmente para papaína. PepBA y papaína una mejor eficiencia catalítica para la hidrólisis de ALA y BLG que cardosina A y B de acuerdo al estudio de Barros & Malcata (2002).

4.2 Caracterización de los hidrolizados de proteínas de LS

4.2.1 Grado de hidrólisis

Se prepararon hidrolizados de LS y sus proteínas mayoritarias por separado en condiciones de proteólisis que favorecieron la formación de un producto con alto contenido de péptidos con masa menor a 3,0 kDa. De acuerdo a los resultados mostrados en el capítulo anterior, los hidrolizados fueron preparados con PepBA utilizando una relación E/S= 1,0 UE/mg, a pH 9,2 y 50 °C.

Los resultados indicaron que en las condiciones de hidrólisis seleccionadas el grado de hidrólisis alcanzado dependió del tiempo de reacción y del sustrato (FIGURA 21). En la hidrólisis de ALA purificada se alcanzó un DH máximo del 17 % a los 40 min, mientras que para BLG aislada fue del 30 % y para LS fue del 13 % a los 120 min. Debido a que la relación E/S (U/mg proteína sustrato) fue la misma en los tres casos, los resultados indicaron que ALA y BLG se hidrolizaron en mayor grado cuando fueron la única especie a hidrolizar. Si bien en el ALA y BLG son las proteínas mayoritarias del LS, durante la hidrólisis también estaban presentes otras proteínas y otros componentes del LS y/o de PepBA (sales, lípidos, carbohidratos, etc.) que de alguna manera hicieran que el grado de hidrólisis fuese menor.

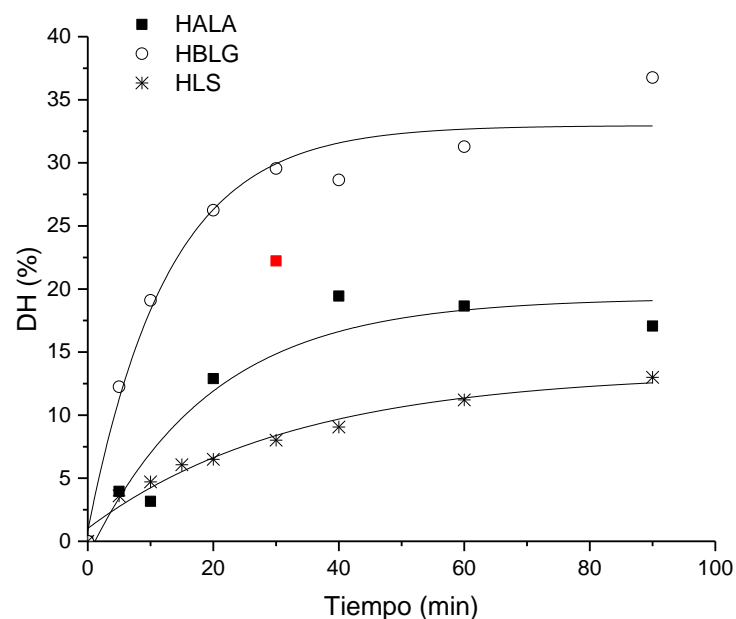


FIGURA 21. Grado de hidrólisis de ALA, BLG y LS con PepBA (E/S=1,0 U/mg) a pH 9,2 y 50 °C.

Los resultados indicaron que las peptidasas de *B. antiacantha* en las condiciones ensayadas son efectivas para producir péptidos de tamaño menor a 3000 Da. Los perfiles electroforéticos y densitogramas, de los hidrolizados de LS (FIGURA 22 A), ALA (FIGURA 22 B) y BLG (FIGURA 22 C), muestran una disminución importante en el tamaño de las bandas correspondientes a ALA y BLG

intactas y la aparición de péptidos de masa molecular menor de 3,0 kDa en el transcurso de la reacción de hidrólisis (FIGURA 22, A-C).

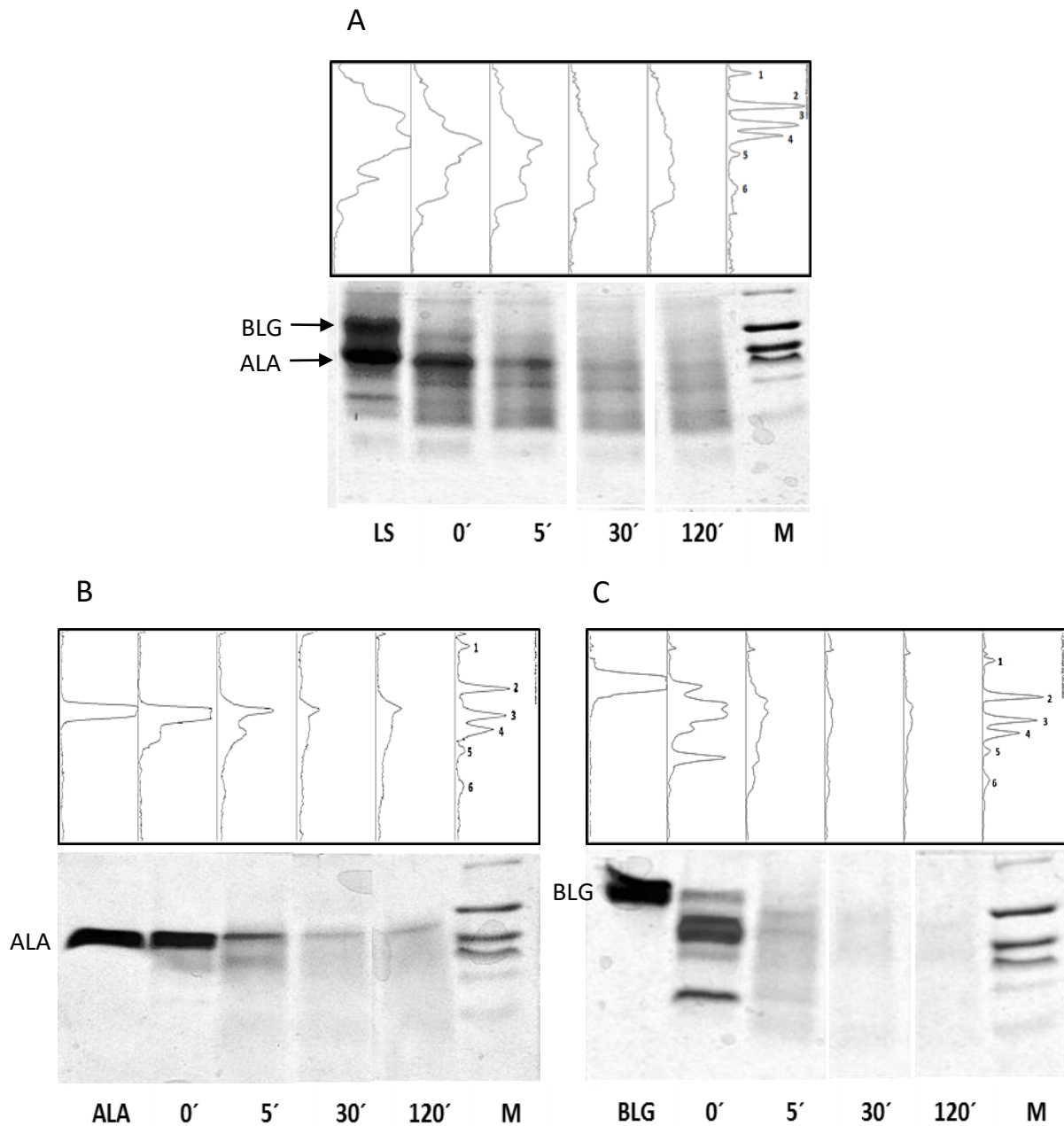


FIGURA 22. Tricine SDS-PAGE y los densitogramas correspondientes de hidrolizados de: LS (A); ALA (B) y BLG (C) con PepBA (E/S=1,0 U/mg) a pH 9,2, 50 °C y diferentes tiempos de reacción. M = marcador de masa molecular Ultra-Low Range: 26,6 kDa (1), 17,0 kDa (2), 14,2 kDa (3), 6,5 kDa (4), 3,496 kDa (5) y 1,06 kDa (6).

Otras peptidasas cisteínicas se han utilizado para hidrolizar LS. La papaína degradó preferencialmente BLG respecto a ALA, en 90 min a pH 8,0 y 43 °C (Lieske & Konrad, 1996). En otro trabajo en el que se hidrolizó LS con papaína a pH 7,0 pero a 70 °C, luego de 15 min se logró la desaparición de la inmunorreactividad de ALA y BLG evidenciando la degradación de ambas proteínas (Peñas et al., 2006). Posiblemente el aumento de la temperatura de la reacción hizo

que ALA fuese hidrolizada. Las peptidasas de *B. hieronymi* son capaces de hacer desaparecer a la ALA intacta en 30 min a pH 6,5, incluso a baja temperatura mientras que para BLG la desaparición fue parcial y sólo ocurrió a 50 °C (Bruno et al., 2010). La desestabilización de la estructura de ALA nativa inducida por el secuestro de Ca^{2+} , causado por el EDTA 0,5 mM presente en el medio de reacción, podría ser el motivo por el cual ALA se hidrolice preferencialmente en estas condiciones.

4.2.2 Evaluación de la actividad IECA-I *in vitro*

4.2.2.1 Evolución de la actividad IECA-I en función del tiempo de hidrólisis

Se estudió la evolución de la actividad IECA-I de las fracciones de los hidrolizados de LS, ALA y BLG en función del tiempo de hidrólisis.

Los hidrolizados se ultrafiltraron para obtener fracciones menos complejas, libres de péptidos mayores a 3 kDa, proteínas no hidrolizadas y enzimas. Se obtuvieron fracciones enriquecidas en moléculas de tamaño mayor a 3,0 kDa (las que se denominaron concentrados) y fracciones con moléculas de tamaño menor a 3,0 kDa (las que se denominaron filtrados) en las que se esperaba encontrar péptidos IECA-I.

El tiempo de hidrólisis necesario para obtener la mayor actividad IECA se determinó en base al coeficiente de efectividad de inhibición (CEI). Comparado los CEI de los concentrados y filtrados de cada hidrolizado, se evaluó la efectividad del paso de ultrafiltración (UF) para enriquecer las fracciones en los péptidos de interés.

Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de PepBA para liberar secuencias con actividad IECA encriptadas en las proteínas del LS (TABLA 7). Tanto los concentrados de HLS (CHLS) como los filtrados de HLS (FHLS) obtenidos a 30 min de hidrólisis presentaron una importante actividad IECA (93 y 83 % respectivamente). Las fracciones correspondientes a hidrolizados obtenidos a tiempos mayores mostraron poco cambio de la actividad inhibitoria, como en el CHLS y el concentrado de HALA (CHALA), o esta presentó diferencias no significativas como en el FHLS, el filtrado de HALA (FHALA), el concentrados de HBLG (CHBLG) y el filtrado de HBLG (FHBLG). Este resultado es importante debido a que generalmente los tiempos de hidrólisis reportados para lograr porcentajes de inhibición de esta magnitud son mucho mayores. Abubakar, Saito, Kitazawa, Kawai, & Itoh (1998) obtuvieron hidrolizados de LS de queso con actividad IECA entre 57 y 96 % utilizando diferentes peptidasas digestivas, proteinasa K y actinasa F como resultado de hidrólisis durante 24 h. También se obtuvieron hidrolizados de aislado de LS³ con actividad IECA de 91 % y 77 % (Silvestre et al., 2012) luego de 5 h de hidrólisis con pancreatina y papaína, respectivamente.

³ Traducción del inglés de WPI (whey protein isolate)

TABLA 7. Evolución de la actividad inhibitoria de IECA (IECA) y de la concentración peptídica con el tiempo de hidrólisis de fracciones obtenidas por ultrafiltración con membranas Amicon Ultra (Corte 3 kDa) de hidrolizados de LS (9,8 mg/mL), ALA (1,3 mg/mL) y BLG (3,3 mg/mL) respectivamente. Los valores con el mismo superíndice no presentan diferencias significativas.

Fracción	Tiempo (min)	IECA (%)	Concentración peptídica* (mM)
CHLS	0	4,60 ± 0,04	1,300 ± 0,006
CHLS	30	93,00 ± 0,04	1,400 ± 0,017 ^f
CHLS	60	87,00 ± 0,08	1,400 ± 0,005 ^f
CHLS	120	84,00 ± 0,15	1,400 ± 0,001
FHLS	0	0,75 ± 0,75	0,160 ± 0,004
FHLS	30	89,00 ± 0,05 ^a	0,530 ± 0,008
FHLS	60	92,00 ± 0,40 ^a	0,700 ± 0,009 ^g
FHLS	120	93,00 ± 0,35 ^a	0,710 ± 0,004 ^g
CHALA	0	46,00 ± 2,50	1,100 ± 0,005
CHALA	30	67,00 ± 0,10	0,610 ± 0,0004
CHALA	60	86,00 ± 0,50 ^b	0,540 ± 0,0005
CHALA	120	82,00 ± 0,50 ^b	0,480 ± 0,003
FHALA	0	2,50 ± 0,50	0,072 ± 0,001 ^h
FHALA	30	100,00 ± 0,10 ^c	0,071 ± 0,001 ^h
FHALA	60	96,00 ± 2,50 ^c	0,130 ± 0,002
FHALA	120	100,00 ± 6,00 ^c	0,160 ± 0,001
CHBLG	0	0	1,400 ± 0,003 ⁱ
CHBLG	30	82,00 ± 0,20	1,500 ± 0,003 ⁱ
CHBLG	60	80,00 ± 0,05 ^d	1,200 ± 0,023
CHBLG	120	100,00 ± 0,50 ^d	1,400 ± 0,001 ⁱ
FHBLG	0	0	0,053 ± 0,001
FHBLG	30	94,00 ± 0,05	0,095 ± 0,002
FHBLG	60	100,00 ± 0,06 ^e	0,300 ± 0,001
FHBLG	120	100,00 ± 0,05 ^e	0,450 ± 0,001

*Concentración de la fracción en el ensayo de actividad IECA. CHLS= concentrado de hidrolizado de LS; FHLS= filtrado de hidrolizado de LS; CHALA= concentrado de hidrolizado de ALA; FHALA= filtrado de hidrolizado de ALA; CHBLG= concentrado de hidrolizado de BLG; FHBLG= filtrado de hidrolizado de BLG

A tiempo cero la actividad IECA fue nula para las fracciones del hidrolizado de BLG. Mientras que para LS y ALA presentaron una actividad IECA inicial medible pero la hidrólisis con PepBA produjo un aumento notorio de la actividad IECA. Esto fue especialmente importante en las fracciones de los hidrolizados de tamaño menor a 3 kDa. Por ejemplo, en el FHLS correspondiente al HLS obtenido a 30 min de hidrólisis la actividad IECA fue del 89 %, mientras que para el correspondiente al HLS obtenido a tiempo cero fue de 0,75 %. La actividad IECA que presentó la muestra inicial pudo deberse a péptidos generados rápidamente a partir de ALA debido a que las peptidasas no fueron inmediatamente inactivadas. De todas formas, el incremento de la actividad IECA a 30 min de agregado de PepBA demostró la producción de péptidos IECA con el avance de la hidrólisis de las proteínas del LS.

4.2.2.2 Coeficiente de eficiencia de inhibición

Teniendo en cuenta la concentración peptídica de las fracciones fue posible estimar la potencia de cada fracción a través del CEI. En la FIGURA 23 se puede ver claramente que todos los filtrados presentaron CEI más altos que los concentrados correspondientes, resultando fracciones más potentes y haciendo evidente el beneficio del paso de UF. Esto es coherente con el hecho de que los péptidos IECA más efectivos son aquellos de tamaño pequeño, principalmente di o tri péptidos (Hong et al., 2008).

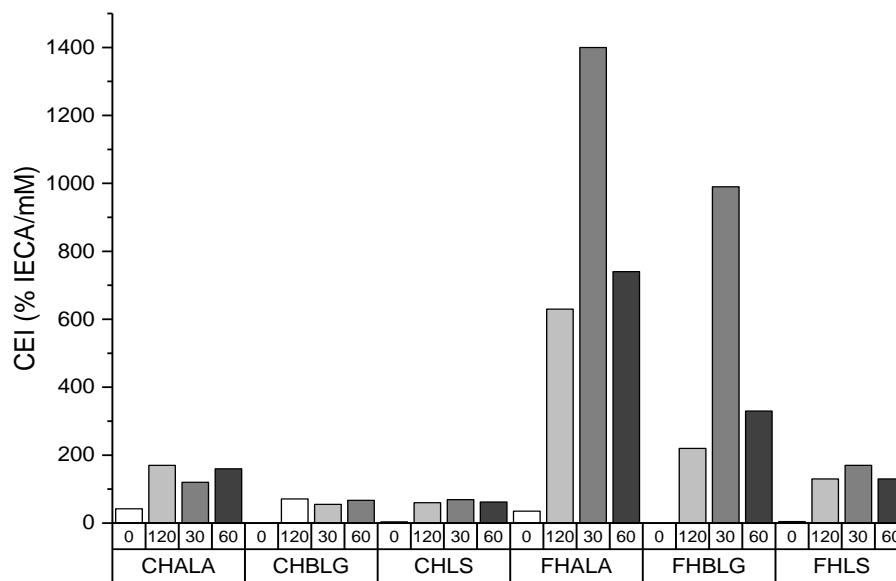


FIGURA 23. Evolución del coeficiente de eficiencia de inhibición (CEI) con el tiempo de hidrólisis de las fracciones obtenidas por ultrafiltración con membranas Amicon Ultra (Corte 3 kDa) de hidrolizados de LS (9,8 mg/mL), ALA (1,3 mg/mL) y BLG (3,3 mg/mL) respectivamente.

Los filtrados correspondientes a los hidrolizados obtenidos a 30 min de reacción fueron los que presentan mayor diferencia de CEI respecto a sus concentrados y fueron las fracciones más potentes. Se registraron CEI 2,5, 12 y 18 veces mayores para los filtrados respecto a los concentrados correspondientes a los hidrolizados de LS, ALA y BLG respectivamente. El FHALA fue el que registró el mayor CEI ($1,4 \times 10^3$ % IECA/mM), seguido de FHBLG ($9,9 \times 10^2$ % IECA/mM) y FHLS ($1,7 \times 10^2$ % IECA/mM). Debido a que el CEI del FHALA fue 1,4 veces mayor que el del FHBLG es posible que PepBA fuera capaz de liberar secuencias activas más potentes o en mayor abundancia a partir de ALA que de BLG. Por otra parte, BLG y ALA son las proteínas mayoritarias del LS (80 %) y sus hidrolizados presentaron actividad IECA por lo que es probable que la mayor parte de los péptidos responsables de la actividad IECA del HLS provengan de estas proteínas. El CEI del FHLS fue 8,2 veces menor que el del FHALA lo cual es razonable si se considera que ALA generaría péptidos más potentes que BLG pero al mismo tiempo ALA representa solo el 20 % de las proteínas del LS mientras que BLG el 60 %.

A partir de los 30 min de hidrólisis se registró un leve aumento de la actividad IECA concomitantemente con el aumento de la concentración peptídica resultando en la disminución del CEI para las fracciones de los hidrolizados obtenidos a 60 y 120 min de reacción. Es probable que con el avance de la reacción se hayan generado péptidos sin actividad inhibitoria en una proporción desfavorable respecto a los péptidos inhibidores (CEI menor) que no pudo mejorarse con el proceso de UF realizado o que se hayan degradado los péptidos con actividad IECA producidos inicialmente.

Determinado el tiempo de hidrólisis en el que se obtuvo el mejor CEI, se evaluó el empleo de UF por membranas de menor tamaño de corte con el objetivo de mejorar el CEI. Se comparó el desempeño de membranas de celulosa de corte en 2,0 kDa (Vivaspin 15R, Sartorius) respecto a las de corte en 3,0 kDa (Amicon Ultra-4, Millipore) (Figura 24 y TABLA 8).

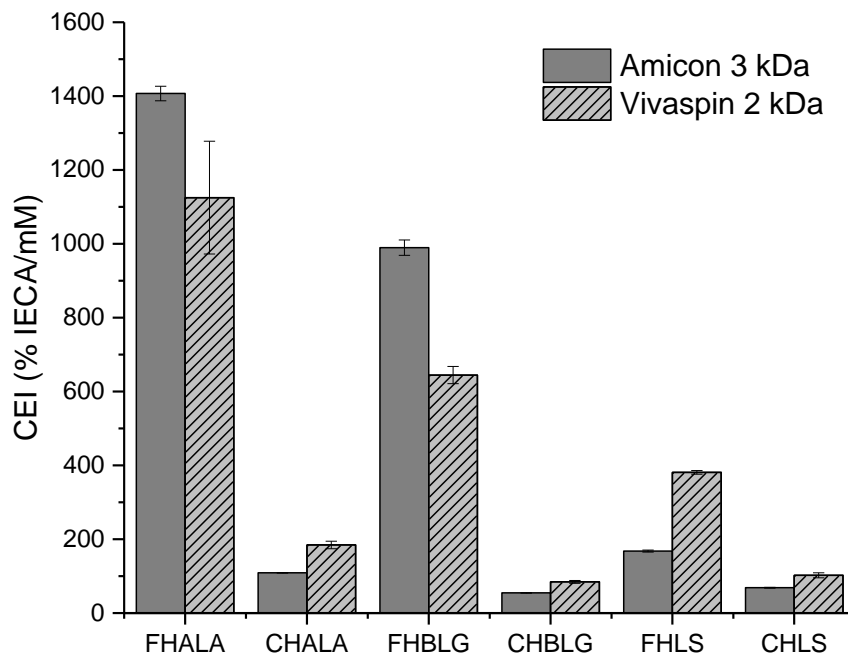


FIGURA 24. Coeficiente de eficiencia de inhibición (CEI) de fracciones de HLS, HALA e HBLG obtenidas por UF por membranas de corte en 3 kDa (Amicon Ultra-4) y 2 kDa (Vivaspin 15R).

TABLA 8. Comparación de los CEI de fracciones de hidrolizados de LS; ALA y BLG con diferentes membranas de UF.				
Sistema	Fracción	IECA (%)	Concentración* (mM eq.)	CEI (% IECA/mM eq)
AMICON ULTRA-4 (3,0 kDa)	FHALA	99,9 ± 0,1	10,071 ± 0,001	1,4 × 10 ³
	CHALA	66,6 ± 0,1	0,611 ± 0,001	1,1 × 10 ²
	FHBLG	94,0 ± 0,1	0,095 ± 0,002	9,9 × 10 ²
	CHBLG	81,8 ± 0,3	1,497 ± 0,003	5,5 × 10 ¹
	FHLS	88,8 ± 0,7	0,529 ± 0,008	1,7 × 10 ²
	CHLS	93,3 ± 1,2	1,361 ± 0,017	6,9 × 10 ¹
VIVASPIN 15 R (2,0 kDa)	FHALA	45 ± 6	0,040 ± 0,001	1,1 × 10 ³
	CHALA	83 ± 2	0,450 ± 0,022	1,8 × 10 ²
	FHBLG	58 ± 2	0,090 ± 0,001	6,4 × 10 ²
	CHBLG	87 ± 4	1,030 ± 0,008	8,4 × 10 ¹
	FHLS	80 ± 1	0,210 ± 0,001	3,8 × 10 ²
	CHLS	93 ± 6	0,910 ± 0,007	1,0 × 10 ²

*Concentración de la fracción en el ensayo de actividad IECA

Para las fracciones de HLS, los mejores resultados se obtuvieron con la membrana de corte en 2 kDa. Como era esperado, el filtrado que contiene péptidos de tamaño menor a 2 kDa presentó un mayor CEI. Si bien, en el concentrado se conservó actividad IECA, esta fue despreciable debido a que el coeficiente de efectividad fue casi cuatro veces menor evidenciando que la fracción estaba poco enriquecida en péptidos IECA-I.

4.2.3 Relación dosis-respuesta de las fracciones con actividad IECA-I

Para evaluar la potencia de inhibición de las muestras y la efectividad del paso de UF (Vivaspin 15R, 2 kDa) se estudió la relación dosis respuesta de los hidrolizados sin fraccionar y de los filtrados. En todos los casos (FIGURAS 25-27), se observó una relación dosis-respuesta entre la concentración peptídica y la capacidad de inhibir a ECA-I.

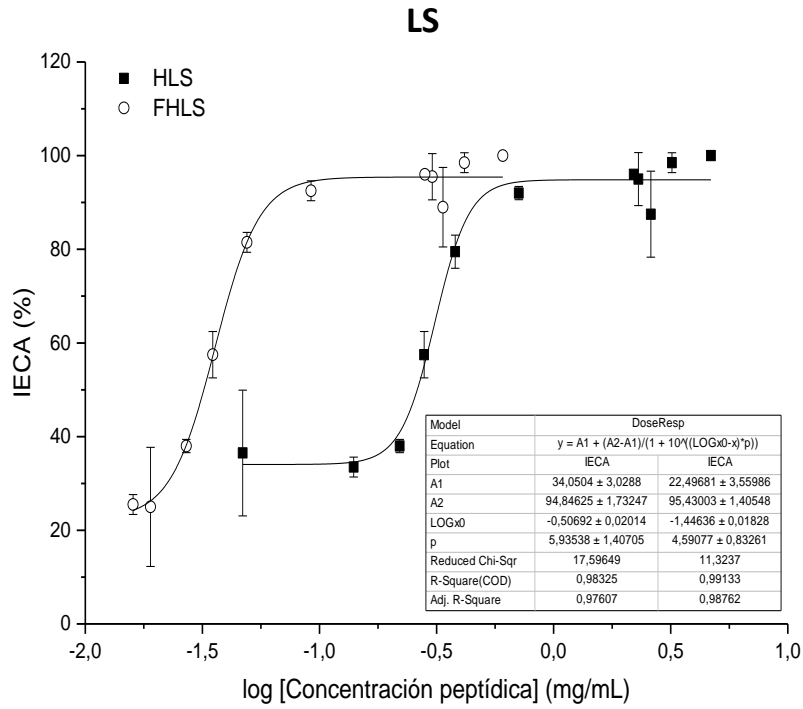


FIGURA 25. Relación dosis-respuesta de la actividad IECA (%) en función de la concentración de HLS y FHLS.

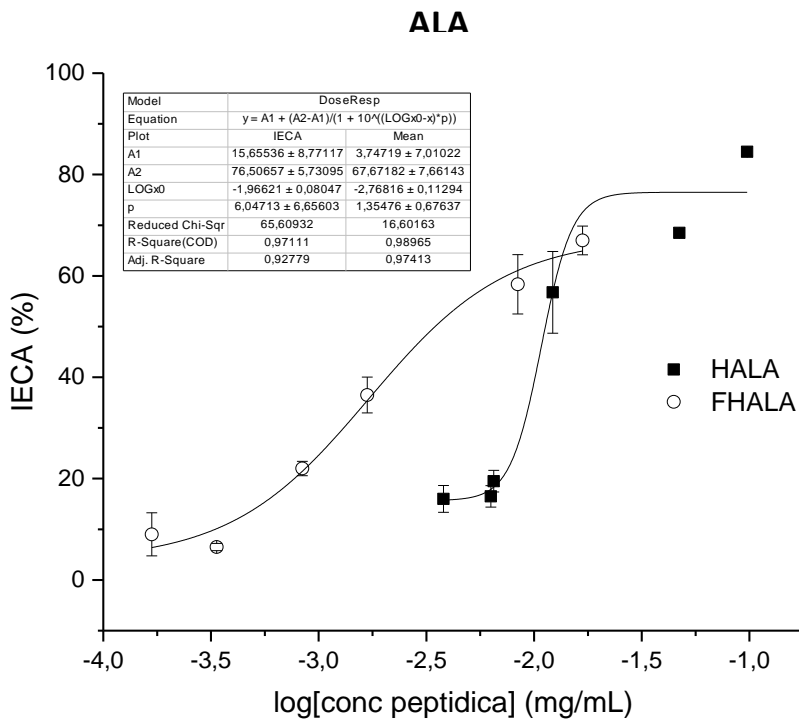


FIGURA 26. Relación dosis-respuesta de la actividad IECA (%) en función de la concentración de HALA y FHALA.

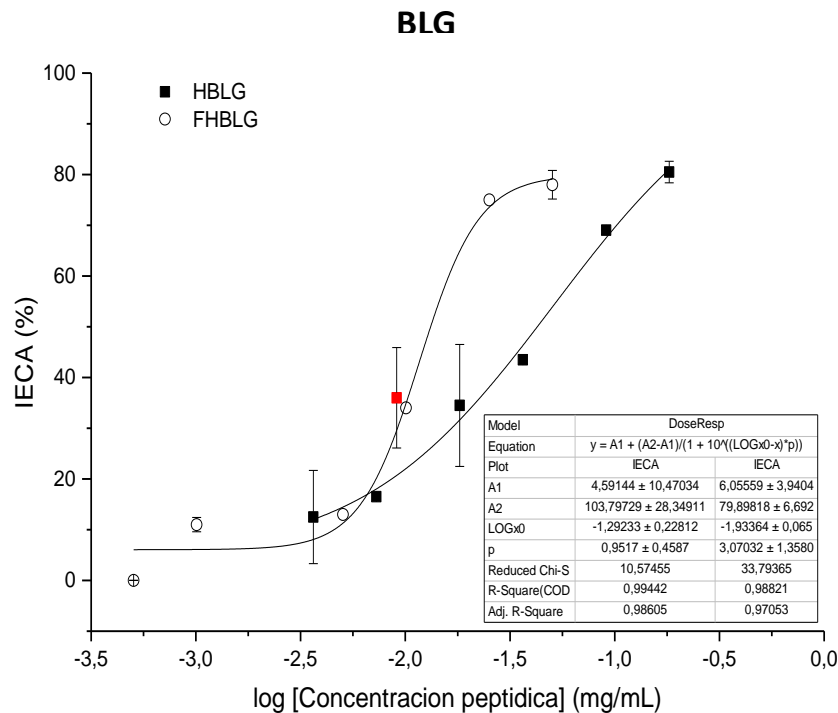


FIGURA 27. Relación dosis-respuesta de la actividad IECA (%) en función de la concentración de HBLG y FHBLG.

Para todas las muestras los filtrados presentaron valores de IC_{50} menores que los correspondientes a los hidrolizados sin fraccionar (TABLA 9), confirmando que se produjeron péptidos IECA con tamaño molecular menor a 2 kDa. La efectividad del proceso de UF para obtener fracciones más enriquecidas en los péptidos de interés fue confirmada.

TABLA 9. Concentración inhibitoria del 50 % de la actividad IECA-I (IC_{50}) de hidrolizados sin fraccionar y filtrados de hidrolizados de LS, ALA y BLG.

Muestra	IC_{50} (mg/mL)
HLS	$(3,1 \pm 0,1) \times 10^{-1}$
FHLS	$(3,6 \pm 0,2) \times 10^{-2}$
HALA	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^{-2}$
FHALA	$(2,0 \pm 0,4) \times 10^{-3}$
HBLG	$(5,8 \pm 2,8) \times 10^{-2}$
FHBLG	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^{-2}$

HLS= hidrolizado de LS; FHLS= filtrado de HLS; HALA= hidrolizado de ALA; FHALA= filtrado de HALA; HBLG= hidrolizado de BLG; FHBLG= filtrado de HBLG

Los valores de IC_{50} obtenidos indicaron que los hidrolizados de proteínas de LS presentaron elevada potencia. De acuerdo a los datos publicados sobre los valores de IC_{50} de hidrolizados de proteínas lácteas obtenidos con otras peptidasas de plantas (TABLA 10) la potencia de los hidrolizados obtenidos en este trabajo fue destacable. Los valores fueron del mismo orden al obtenido por Tavares et al. (2011) para un hidrolizado de concentrado de proteínas de LS

(fracción menor a 3 kDa) preparado en siete horas empleando un extracto crudo de flor de cardo (*Cynara cardunculus*). En nuestro caso, el hidrolizado de LS con un extracto de frutos maduros de *Bromelia antiacantha*, fue preparado en 30 minutos. El corto tiempo de hidrólisis puede ser un factor muy favorable desde el punto de vista económico para la producción industrial del hidrolizado. Se confirmó la capacidad de PepBA para liberar péptidos IECA-I encriptados en las secuencias de ALA y BLG. Los valores de IC_{50} obtenidos del filtrado de HALA marcaron la presencia de péptidos más potentes o una menor proporción de péptidos que no presentaron actividad inhibitoria respecto a los péptidos IECA-I.

TABLA 10. IC_{50} de hidrolizados de proteínas lácteas con peptidasas de plantas.			
Sustrato	Peptidasa	IC_{50} (mg/mL)	Referencia
Leche bovina	Pomiferina (serin peptidasa de látex de <i>Macula pomifera</i>)	16	Corrons, Bertucci, Liggieri, López, & Bruno, 2012
Suero de queso		0,53	Bertucci, Liggieri, Colombo, Vairo Cavalli, & Bruno, 2015
Caseína		1,72	Corrons, Liggieri, Trejo, & Bruno, 2017
BLG	Serin-Peptidasa de <i>Cucurbita ficifolia</i>	0,625 ^a	
WPI-80		0,800 ^a	Babij, et al., 2014
WPC - Kerrylac 750	Papaína	0,175	Silvestre, et al., 2012
WPC	Extracto crudo de <i>Cynara cardunculus</i>	0,024 ^b	Tavares, et al., 2011

^aValor correspondiente a una fracción purificada por RP-HPLC a partir del hidrolizado.
^bValor correspondiente a la fracción del hidrolizado de masa molecular menor a 3,0 kDa.
WPC= concentrado de proteínas de LS; WPI= aislado de proteínas de LS

4.2.4 Caracterización de los perfiles peptídicos

Utilizando cromatografía de exclusión molecular (SEC) fue posible evaluar la complejidad y estimar la distribución de tamaños de los componentes de los hidrolizados y de las fracciones de UF obtenidas a partir de ellos. Los cromatogramas del HLS, HALA, HBLG y de sus fracciones de UF se muestran en la FIGURA 28. A partir de la calibración de la columna con estándares (ver Apéndice 2), se estableció que el rango de comportamiento lineal entre el tiempo de retención (T_R) y el log de la masa molecular fue de 200 a 3000 Da ($T_R = 37,5 \text{ min} - 22,5 \text{ min}$). De acuerdo a esto, se dividió el cromatograma en cinco fracciones (F1-F5) que comprendieron diferentes rangos de tamaño molecular. La fracción F1 ($T_R > 22,5 \text{ min}$) correspondió a componentes de tamaño mayor a 3000 Da; F2 (T_R entre 22,5 y 24,5 min) entre 3000 y 2000 Da; F3 (T_R entre 24,5 y 31,6 min) entre 2000 y 600 Da; F4 (T_R entre 31,6 y 37,5 min) entre 600 y 200 Da y F5 ($T_R > 37,5 \text{ min}$) menor a 200 Da.

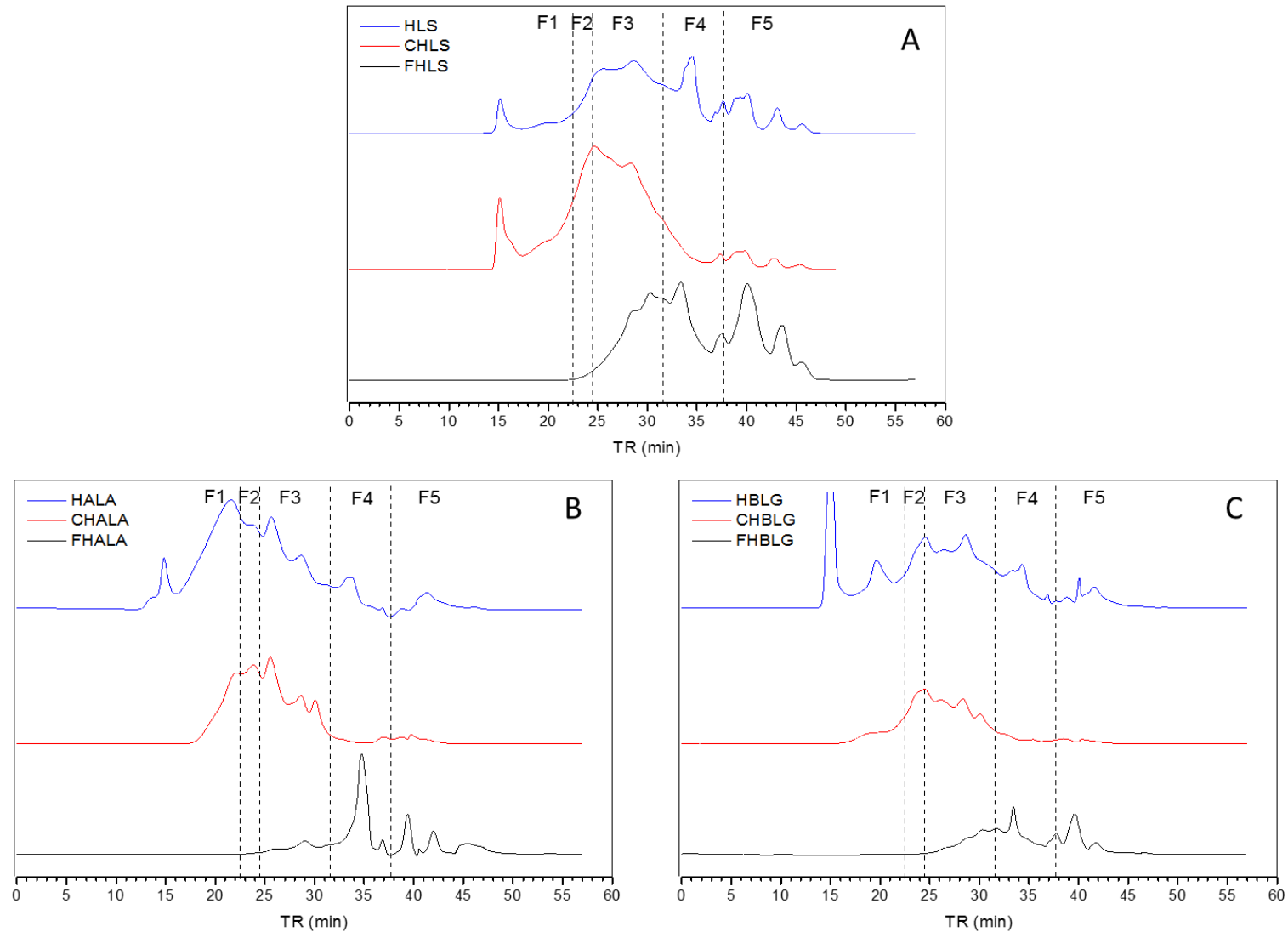


FIGURA 28. SEC en columna Superdex Peptide 10/300 GL de hidrolizados de proteínas de LS, ALA y BLG y las correspondientes fracciones de UF (UF) con membranas de corte en 2,0 kDa (Vivaspin 15R). Los hidrolizados fueron preparados con PepBA a pH 9,2 y 50 °C durante 30 min. (A) HLS sin fraccionar, concentrado de UF (CHLS) y filtrado de UF (FHLS); (B) HALA sin fraccionar, concentrado de UF (CHALA) y filtrado de UF (FHALA); HBLG sin fraccionar, concentrado de UF (CHBLG) y filtrado de UF (FHBLG).

Como se puede apreciar en los cromatogramas (FIGURA 28) todos los hidrolizados presentaron componentes en los cinco rangos de tamaño molecular reflejando su complejidad. Para los filtrados de UF se observaron componentes de tamaño menor a 2000 Da como era esperado. En los concentrados de UF además de los componentes de tamaño mayor a 2000 Da se observó la presencia de componentes en el rango de tamaño de 600 a 2000 Da que no fueron completamente transferidos a los filtrados. La presencia de péptidos menores a 2000 Da, fue esperable para un proceso de UF, y posiblemente fueron los responsables de la actividad IECA con bajo CEI detectada en estas fracciones (sección 3.2.2.2.).

Los perfiles de HLS y HBLG (FIGURA 28 A y C respectivamente) fueron muy parecidos en las fracciones F2-F5 seguramente porque BLG es la proteína mayoritaria del LS (50 % de abundancia). El perfil del HALA (FIGURA 28 B) presentó diferencias apreciables respecto al perfil del HBLG en las fracciones F1 y F3. Las diferencias en la fracción de mayor tamaño (F1) observada en ambos hidrolizados de las proteínas mayoritarias del LS puede deberse a que la degradación de ALA y BLG en el contexto del LS presente una cinética diferente que cuando estas proteínas se hidrolizan aisladas.

Para estimar la distribución de tamaños de los hidrolizados se calculó el área de cada zona del cromatograma correspondiente a las fracciones F1 a F5 y el resultado se expresó como porcentaje respecto al área total del cromatograma. Los resultados se muestran en la FIGURA 29. El HLS (FIGURA 29 A) presentó un 84 % de componentes de tamaño menor a 2000 Da dentro de los cuales el 24 % correspondió a un rango de tamaño compatible con di o tripéptidos (fracción F4). En el FHLS el porcentaje de la fracción F4 fue del 31,7 % configurando una muestra con alto porcentaje de componentes con tamaño molecular en el rango de los péptidos IECA más potentes.

Para el HALA el porcentaje de los componentes de tamaño menor a 2000 Da fue del 48 % (FIGURA 29B), indicando que este hidrolizado tuvo una considerable proporción de péptidos de tamaño mayor a 2000 Da o proteínas sin hidrolizar que es coherente con los perfiles electroforéticos del HALA (FIGURA 22B) donde se observó ALA intacta remanente aun a los 120 min de hidrólisis. En este caso resultó especialmente adecuado el empleo de UF para el enriquecimiento de la muestra en la fracción peptídica del tamaño de interés. Como se puede observar en la FIGURA 29B, los componentes de las fracciones F4 y F5 representaron el 9 y 8 % del HALA mientras que en el FHALA fueron el 51 y 31 % indicando un alto enriquecimiento del FHALA en estos componentes.

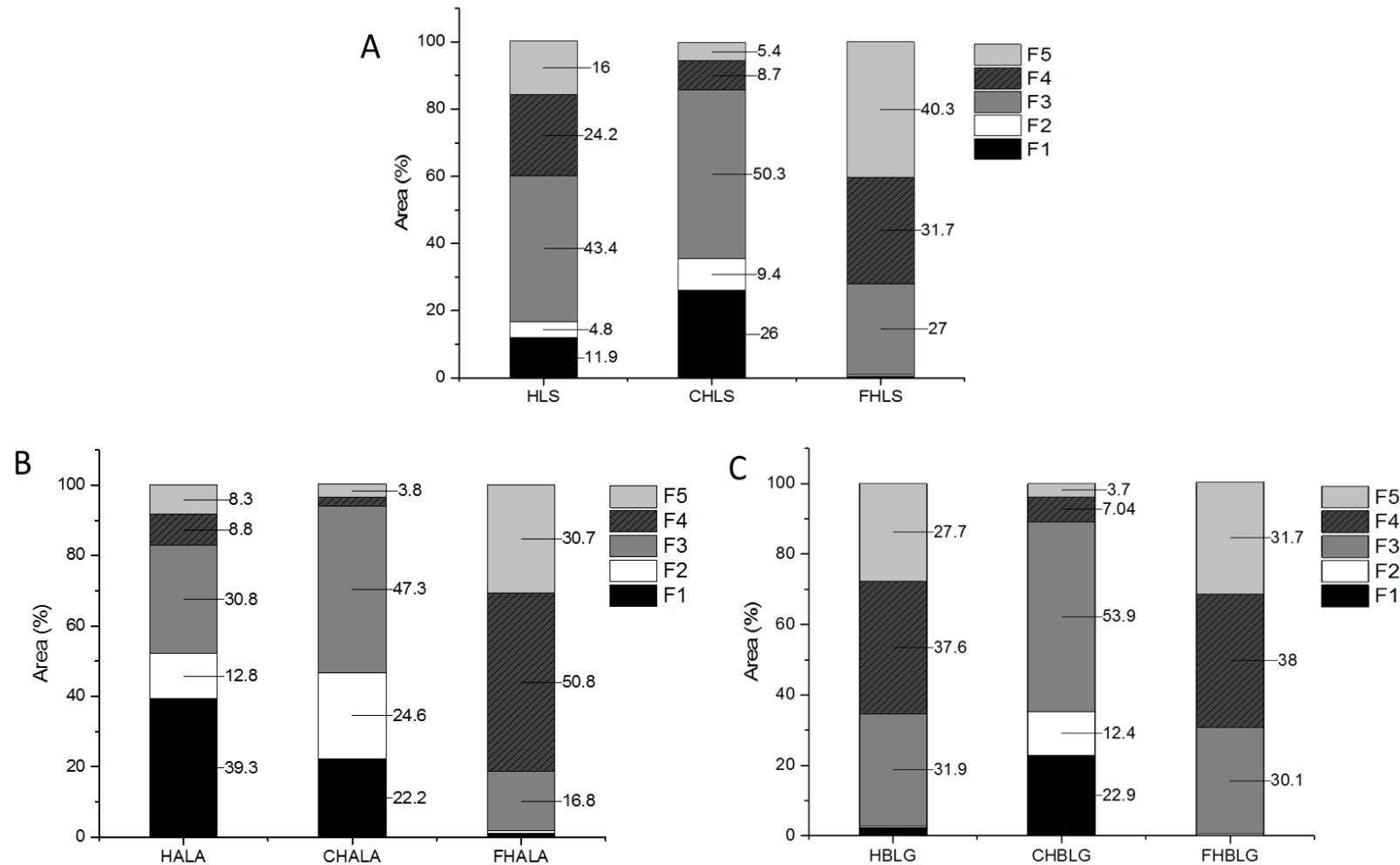


FIGURA 29. Distribución de tamaños de hidrolizados y fracciones de UF analizadas por SEC HPLC (columna Superdex Peptide 10/300 GL). Para cada muestra se realizó el perfil peptídico calculando el porcentaje del área de cada fracción del cromatograma (F1-F5) en relación al área total del cromatograma. (A) HLS, CHLS y FHLS; (B) HALA, CHALA y FHALA; (C) HBLG, CHBLG y FHBLG. La fracción F1 ($T_R < 22,5$ min) componentes de tamaño mayor a 3000 Da; F2 (T_R entre 22,5 y 24,5 min) entre 3000 y 2000 Da; F3 (T_R entre 24,5 y 31,6 min) entre 2000 y 600 Da; F4 (T_R entre 31,6 y 37,5 min) entre 600 y 200 Da y F5 ($T_R > 37,5$ min) menores a 200 Da.

Así mismo el valor de IC_{50} del FHALA es un orden de magnitud menor que el del HALA evidenciando el enriquecimiento del FHALA a nivel de los péptidos de interés.

HBLG fue el hidrolizado que presentó el más alto contenido de componentes menores a 2000 Da (97 %), esto coincide con lo observado en el perfil electroforético del HBLG (FIGURA 22C) donde se evidenció una degradación extensa de BLG, desapareciendo la banda de BLG intacta desde los tiempos iniciales de la hidrólisis. En este caso, el valor de IC_{50} del FHBLG respecto al del HBLG aumentó en menor medida que los correspondientes a ALA, seguramente debido a que ambas fracciones estaban enriquecidas en péptidos de tamaño menor a 2000 Da. Las fracciones F4 y F5 presentaron porcentajes semejantes tanto en el HBLG como en el FHBLG.

4.2.5 Digestión gastrointestinal *in vitro* de fracciones peptídicas con actividad IECA-I

Las fracciones FHLS, FHALA o FHBLG se sometieron a un proceso enzimático en dos etapas con pepsina y la mezcla de tripsina y quimotripsina, para simular el proceso de digestión gastrointestinal antes de ser absorbidas en el intestino. Los resultados mostraron que el FHLS fue resistente al proceso de digestión *in vitro* o hubo una digestión que no fue relevante debido a que no se observaron cambios en el porcentaje de inhibición de ECA-I entre la muestra sometida a la simulación de digestión gastrointestinal y el control (FIGURA 30). En el caso del FHALA y del FHBLG, la actividad IECA-I aumentó levemente luego de la digestión gastrointestinal simulada en comparación con el control (FIGURA 30).

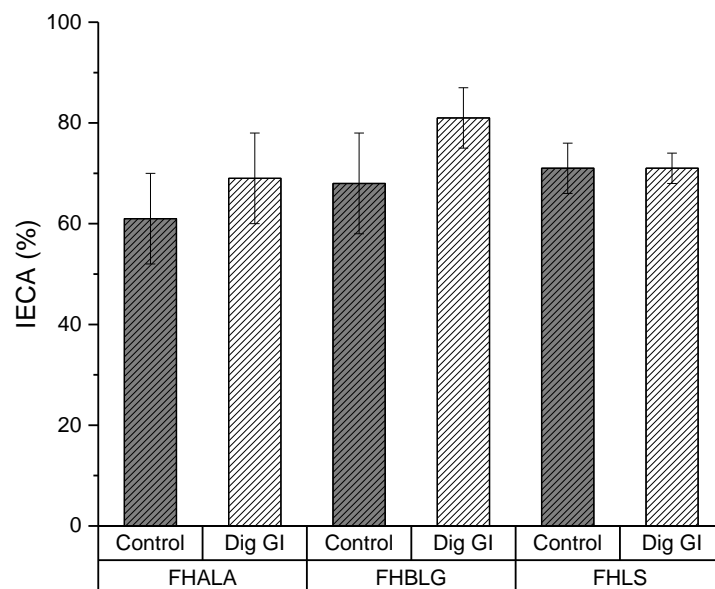


FIGURA 30. Actividad IECA-I (%) luego de la simulación de digestión gastrointestinal de FHALA, FHBLG y FHLS. Para cada muestra se realizó paralelamente un control en el que no se utilizaron las enzimas gastrointestinales.

Los resultados mostraron que el proceso de digestión gastrointestinal simulado no afectó la actividad IECA-I de los filtrados significativamente. Se han descrito tres tipos de péptidos inhibidores de ECA-I: los que son verdaderos inhibidores, los sustratos de ECA-I (que pueden

competir con los sustratos fisiológicos y pueden tener una baja actividad IECA-I) y que son del tipo prodroga, es decir que contienen secuencias activas que pueden ser liberadas por las enzimas gastrointestinales o la ECA-I (Iwaniak, Minkiewicz, & Darewicz, 2014). Debido a la complejidad demostrada de estas fracciones es posible que el efecto de las enzimas gastrointestinales pueda generar nuevas secuencias que IECA-I a partir de péptidos del tipo prodroga además de aportar nuevas secuencias que puedan actuar como sustratos de ECA-I.

4.3 Evaluación de diferentes estrategias para la separación de péptidos IECA-I de hidrolizados de proteínas de LS

La purificación de los péptidos responsables de la actividad IECA-I inicialmente fue abordada utilizando las estrategias clásicas de purificación de péptidos. Como primer paso se evaluó la cromatografía de exclusión molecular (SEC) debido a la evidencia de la relación entre el tamaño molecular y la actividad IECA-I. También se exploró la purificación en base a las diferencias de hidrofobicidad de los péptidos utilizando fraccionamiento por extracción en fase sólida y RP-HPLC. Las diferentes estrategias abordadas y los resultados obtenidos se muestran y discuten a continuación.

4.3.1 Cromatografía de exclusión molecular

4.3.1.1 Purificación de péptidos IECA-I a partir de HLS

El FHLS del hidrolizado de 30 min se fraccionó por SEC utilizando una columna de Sephadex G-25. El cromatograma obtenido (FIGURA 31) mostró una composición compleja, revelando la amplia distribución de tamaños de los componentes del filtrado del hidrolizado. Las fracciones de diferentes zonas del cromatograma se combinaron formando ocho pools que se describen en la TABLA 11. La actividad IECA-I (%) de todos los pools se evaluó y se detectó actividad en todos excepto en el pool F. Los valores más altos de actividad IECA-I (%) y CEI se obtuvieron en los pools A, B, D y H (mayor al 92 % y mayor a 5000 %/mM respectivamente).

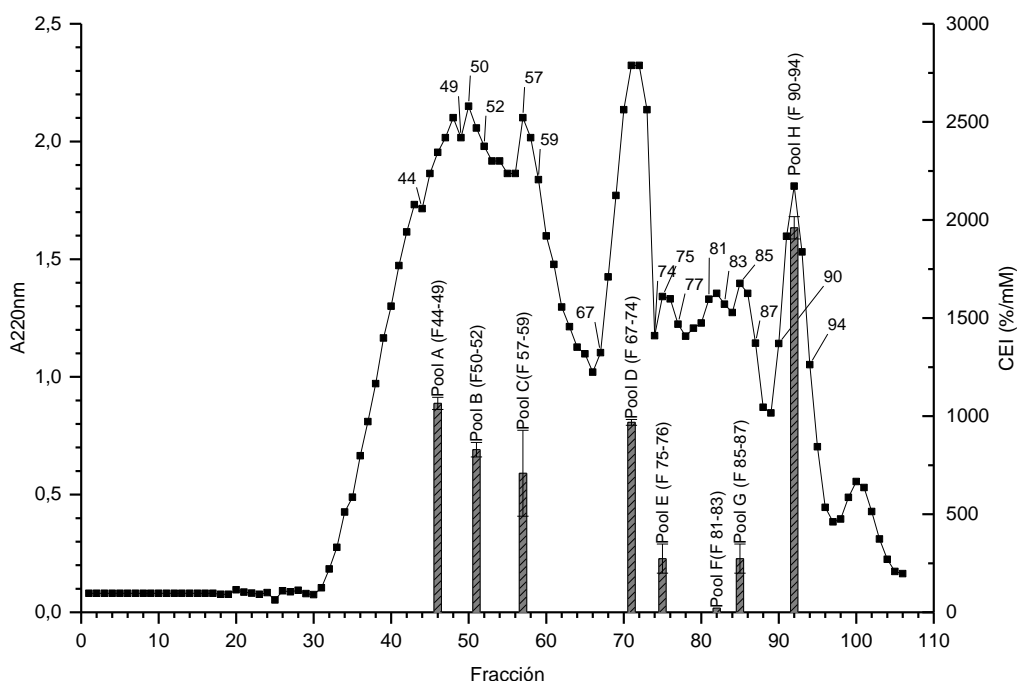


FIGURA 31. SEC en columna Sephadex G-25 (270 mm de largo y 180 mm DI) de FHLS (5x), se inyectó 0,5 mL de muestra, el flujo fue de 0,5 mL/min. Fracciones de 0,5 mL. Fase móvil: ACN 30 % (v/v), TFA 0,1 % (v/v) en agua Milli Q. En columnas se muestra la actividad IECA-I (%) de pools de fracciones.

Tabla 11. Actividad IECA-I de pools de fracciones de SEC en columna Sephadex G-25 de FHLS.				
Pool	Fracciones	IECA-I (%)	Concentración (mM)*	CEI (%/mM)
A	44-49	98 ± 2,9	$(9,2 \pm 0,5) \times 10^{-2}$	$\frac{1,1 \times 10^3}{8,2 \times 10^2}$
B	50-52	98 ± 5,3	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^{-1}$	$\frac{7,1 \times 10^2}{9,7 \times 10^2}$
C	57-58	78 ± 24	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-1}$	$\frac{2,7 \times 10^2}{9,0}$
D	67-74	92 ± 1,3	$(9,5 \pm 0,9) \times 10^{-2}$	$\frac{3,4 \times 10^2}{2,0 \times 10^3}$
E	75-76	23 ± 6,2	$(8,6 \pm 2,0) \times 10^{-2}$	
F	81-83	0,8 ± 0,8	$(9,4 \pm 1,0) \times 10^{-2}$	
G	85-87	42 ± 1,5	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^{-1}$	
H	90-94	100 ± 3,9	$(5,0 \pm 0,2) \times 10^{-2}$	

* Concentración en el ensayo de actividad IECA-I.

El perfil peptídico de los pools que presentaron mayor actividad IECA-I (pools A, B, C, D y H) se analizó por SEC-HPLC utilizando la columna Superdex Peptide como se describió en la sección 3.2.4 (FIGURA 32). En los cromatogramas de todos los pools, excepto el pool C, se detectaron picos que correspondieron a componentes de tamaño menor a 200 Da (TABLA 12). Posiblemente, no se logró una distribución de estos componentes de acuerdo a su tamaño debido a la abundancia y/o a la formación de agregados de mayor masa molecular favorecido por la alta concentración en la muestra. En las condiciones de la SEC-HPLC en la columna Superdex Peptide las muestras fueron menos complejas y el sistema más eficiente, lográndose su elución en un tiempo de retención (TR) diferente al de los componentes de mayor masa molecular.

TABLA 12. Perfiles de tamaño de los picos detectados en SEC-HPLC en columna Superdex de los pools de SEC en columna Sephadex G-25.			
Pool	Pico	TR (min)	Tamaño (Da)
A	A1	29,10	2000-600
	A2; A3 y A4	43,99; 44,47 y 45,32	< 200
B	B1	31,81	600-200
	B2	40,74	< 200
C	C1	33,04	600-200
D	D1	33,28	600-200
	D2 y D3	37,15; 40,07	< 200
H	H1	34,91	600-200
	H2; H3; H4 y H5	38,83; 40,57; 42,43 y 45,19	< 200

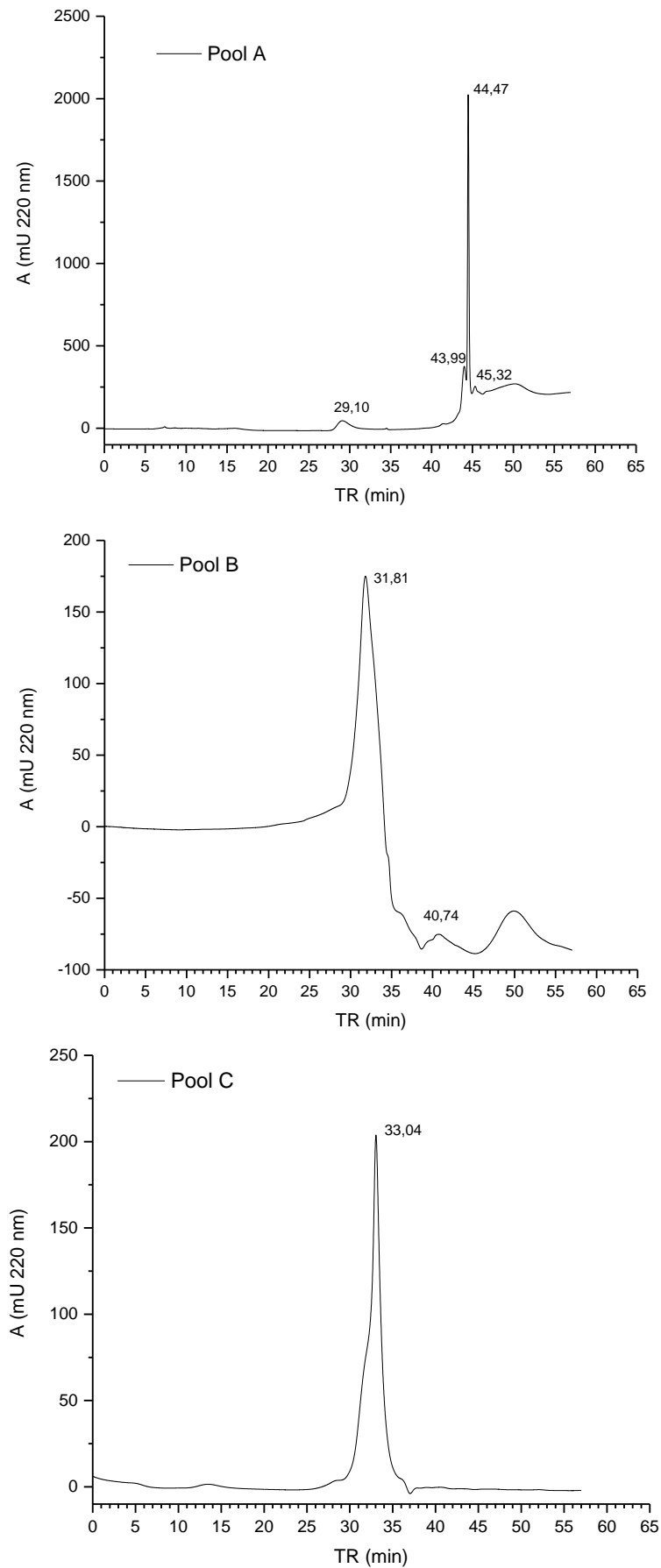
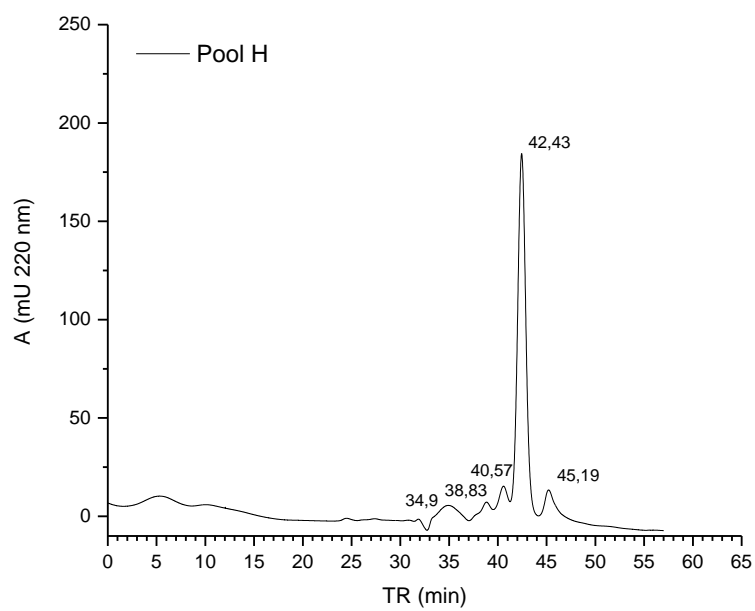
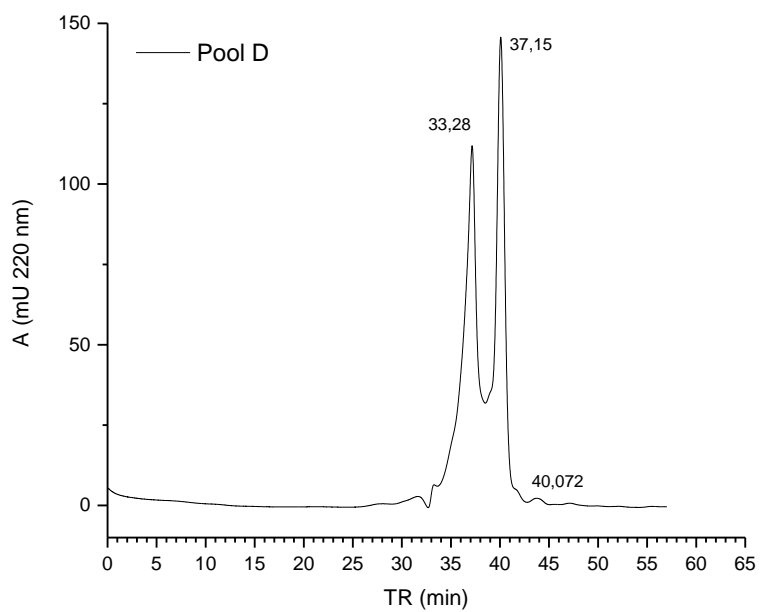


FIGURA 32. SEC-HPLC en columna Superdex Peptide de los pools A, B, C D y H de las fracciones de la SEC en la columna Sephadex G-25.



(FIGURA 32, continuación)

Para analizar la composición peptídica de las muestras se realizó un análisis por espectrometría de masas de los pools A, B, D y H. El análisis de los espectros de masas MALDI-TOF de los pools de fracciones de SEC en columna Sephadex G-25 (Anexo 1) reveló la presencia de 30 masas en el pool A, 31 en el Pool B, 16 en el pool D y 30 en el pool H. Además, de estas masas se encontraron en más de un pool como se muestra en la TABLA 13.

Tabla 13. Masas de los fragmentos que se encontraron en más de un pool de la SEC en columna Sephadex G-25.				
Pooles*				Masa (Da)
A	B			616,9; 1001,3 y 1195,37
A	B	D		1587,45 y 1636,5
A		D		1244,49
A		D	H	927,3
	B	D	H	759,2
	B		H	1282,37
		D	H	616,9; 621,9 y 1076,99

*Pooles en los que se encontró el o los fragmentos especificados

Las masas obtenidas por espectrometría MALDI-TOF de los pooles A, B, D y H se compararon con las correspondientes secuencias de ALA y BLG (UniProtKB/Swiss-Prot, numero de acceso: P00711 y P02754 respectivamente) utilizando la herramienta FindPept con cortes inespecíficos y una tolerancia de diferencia de masas de $\pm 0,2$ Da. Las masas y secuencias posibles para los péptidos presentes en los pooles analizados se muestran en la TABLA 14.

TABLA 14. Secuencias peptídicas teóricas de los péptidos presentes en los pooles A, B, D y H de SEC en Sephadex G-25 de FHLS identificadas en la secuencia precursora de ALA (P00711) y BLG (P02754), con numeración correspondiente a la proteína madura. La comparación de masas experimentales y teóricas fue realizada seleccionando una tolerancia de diferencia de masas de $\pm 0,2$ Da.				
Pool A				
Masa experimental	Masa teórica	Δ masa (Da)	Secuencia teórica	Posición
822,190 ¹	822,355	0,164	(D)DLTDDIM(C)	ALA f 103-109
822,190 ¹	822,366	0,176	(L)CSEKLDQ(W)	ALA f 130-136
916,302	916,468	0,165	(G)INYWLAH(K)	ALA f 120-126
916,302	916,473	0,171	(F)KIDALNEN(K)	BLG f 99-106
916,302	916,473	0,171	(K)IDALNENK(V)	BLG f 100-107
916,302	916,492	0,190	(Q)CLVRTPEV(D)	BLG f 137-144
927,299 ²	927,384	0,085	(T)FHTSGYDT(Q)	ALA f 50-57
927,299 ²	927,384	0,085	(T)TFHTSGYD(T)	ALA f 49-56
949,282	949,466	0,183	EQLTKCEV(F)	ALA f 20-27
984,307	984,457	0,149	(N)PHSSNICNI(S)	ALA f 86-94
1.040,338	1.040,391	0,053	(D)DDLTDIMC(V)	ALA f 102-110
1.040,338	1.040,427	0,089	(D)DLTDDIMCV(K)	ALA f 103-111
1.129,370	1.129,480	0,109	(C)TTFHTSGYDT(Q)	ALA f 48-57
1.131,357	1.131,441	0,084	(V)CTTFHTSGYD(T)	ALA f 47-56
1.244,488 ³	1.244,496	0,008	(W)CKDDQNPSSN(I)	ALA f 80-90

1.244,488 ³	1.244,562	0,073	(V)AGTWYSLAMAAS(D)	BLG f 32-43
1.305,439	1.305,563	0,123	(C)MENSAEPEQSLA(C)	BLG f 123-134
1.305,439	1.305,589	0,150	(L)LQKWENGECAQ(K)	BLG f 74-84
1.305,439	1.305,626	0,186	(K)WENGECAQKKI(I)	BLG f 77-87
1.305,439	1.305,632	0,193	(R)LSFNPTQLEEQ(C)	BLG f 165-175
1.305,439	1.305,635	0,196	(L)AMAASDISLLDAQ(S)	BLG f 39-51
1.448,465	1.448,651	0,185	(L)ACQCLVRTPEVDD(E)	BLG f 134-146
Pool B				
Masa experimental	Masa teórica	Δ masa (Da)	Secuencia teórica	Posición
683,264	683,413	0,148	(K)KYLLF(C)	BLG f 117-121
712,228	712,333	0,105	(N)ISCDKF(L)	ALA f 94-99
712,228	712,333	0,105	(I)SCDKFL(D)	ALA f 95-100
712,228	712,381	0,153	(L)KALPMH(I)	BLG f 157-162
759,255 ⁴	759,425	0,169	(D)ISLLDAQ(S)	BLG f 45-51
759,255 ⁴	759,443	0,188	(K)ALKALPM(H)	BLG f 155-161
781,231	781,402	0,171	(T)KCEVFR(E)	ALA f 24-29
781,231	781,340	0,108	(Y)SLAMAASD(I)	BLG f 37-44
781,231	781,340	0,108	(L)AMAASDIS(L)	BLG f 39-46
803,228	803,383	0,155	(I)NYWLAH(K)	ALA f 121-126
803,228	803,389	0,161	(I)DALNENK(V)	BLG f 101-107
822,190 ¹	822,355	0,164	(D)DLTDDIM(C)	ALA f 103-109
822,190 ¹	822,366	0,176	(L)CSEKLDQ(W)	ALA f 130-136
846,266	846,457	0,190	(D)ISLLDAQS(A)	BLG f 45-52
867,245	867,373	0,128	(C)DKFLDDD(L)	ALA f 97-103
887,283	887,404	0,120	(P)HSSNICNI(S)	ALA f 87-94
887,283	887,458	0,175	(D)TQAIVQNN(D)	ALA f 57-64
887,283	887,397	0,113	(G)TWYSLAM(A)	BLG f 34-40
887,283	887,399	0,116	(T)PEVDDEAL(E)	BLG f 142-149
916,287	916,468	0,180	(G)INYWLAH(K)	ALA f 120-126
916,287	916,473	0,186	(F)KIDALNEN(K)	BLG f 99-106
916,287	916,473	0,186	(K)IDALNENK(V)	BLG f 100-107
919,200	919,389	0,189	(P)EVDDEALE(K)	BLG f 143-150
979,296	979,412	0,115	(F)HTSGYDTQA(I)	ALA f 51-59
981,271	981,456	0,184	(Y)SLAMAASDIS(L)	BLG f 37-46
1.003,311	1.003,484	0,173	(L)LQKWENGE(C)	BLG f 74-81
1.024,292	1.024,433	0,140	(D)DLTDDIMCV(K)	ALA f 103-111
1.045,305	1.045,447	0,142	(N)NDSTEYGLF(Q)	ALA f 64-72
1.045,305	1.045,480	0,174	(E)NSAEPEQSLA(C)	BLG f 125-134
1.113,325	1.113,474	0,149	(D)QNPSSNICN(I)	ALA f 84-93
1.195,369	1.195,559	0,189	(T)SGYDTQAIVQN(N)	ALA f 53-63
Pool D				
Masa experimental	Masa teórica	Δ masa (Da)	Secuencia teórica	Posición
759,246 ⁴	759,425	0,178	(D)ISLLDAQ(S)	BLG f 45-51

759,246 ⁴	759,443	0,197	(K)ALKALPM(H)	BLG f 155-161
927,272 ²	927,384	0,112	(T)FHTSGYDT(Q)	ALA f 50-57
927,272 ²	927,384	0,112	(T)TFHTSGYD(T)	ALA f 49-56
975,323	975,499	0,176	(M)AASDISLLDA(Q)	BLG f 41-50
1.244,391 ³	1.244,496	0,105	(W)CKDDQNPSSN(I)	ALA f 80-90
1.244,391 ³	1.244,562	0,170	(V)AGTWYSLAMAAS(D)	BLG f 32-43
1.253,361	1.253,554	0,193	(Y)LLFCMENSAEP(E)	BLG f 119-129
Pool H				
Masa experimental	Masa teórica	Δ masa (Da)	Secuencia teórica	Posición
624,221	624,251	0,030	(K)FLDDD(L)	ALA f 99-103
624,221	624,321	0,099	(I)MVCVKK(I)	ALA f 109-113
624,221	624,248	0,026	(Q)SLACQC(L)	BLG f 132-137
624,221	624,302	0,081	(V)TQTMK(G)	BLG f 20-24
685,266	685,381	0,115	(P)MHIRL(S)	BLG f 161-165
685,266	685,461	0,194	(E)NKVLVL(D)	BLG f 106-111
714,227	714,403	0,176	(Y)VEELKP(T)	BLG f 59-64
714,227	714,414	0,187	(C)LVRTPE(V)	BLG f 138-143
714,227	714,418	0,191	(D)YKKYL(L)	BLG f 115-119
759,266 ⁴	759,425	0,158	(D)ISLLDAQ(S)	BLG f 45-51
759,266 ⁴	759,443	0,177	(K)ALKALPM(H)	BLG f 155-161
766,283	766,322	0,039	(S)NICNISC(D)	ALA f 90-96
766,283	766,439	0,156	(A)LPMHIR(L)	BLG f 159-164
766,283	766,439	0,156	(L)PMHIRL(S)	BLG f 160-165
787,306	787,377	0,070	(A)HKALCSE(K)	ALA f 126-132
787,306	787,398	0,092	(G)GVSLPEW(V)	ALA f 39-45
787,306	787,446	0,140	(Q)INNKIW(C)	ALA f 74-79
787,306	787,431	0,124	(D)ALNENKV(L)	BLG f 102-108
787,306	787,492	0,186	(N)KVLVLD(D)	BLG f 107-113
831,325	831,384	0,059	(V)RTPEVDD(E)	BLG f 140-146
831,325	831,457	0,132	(L)DIQKVAGT(W)	BLG f 27-34
853,355	853,351	-0,004	(V)CTTFHTSG(Y)	ALA f 47-54
853,355	853,354	0,000	(S)SNICNISC(D)	ALA f 89-96
853,355	853,380	0,024	(C)KDDQNP(S)	ALA f 81-87
853,355	853,430	0,075	(L)VLDTDYK(K)	BLG f 110-116
853,355	853,471	0,116	(K)ALPMHIR(L)	BLG f 158-164
853,355	853,471	0,116	(L)PMHIRLS(F)	BLG f 160-166
927,301 ²	927,384	0,083	(T)FHTSGYDT(Q)	ALA f 50-57
927,301 ²	927,384	0,083	(T)TFHTSGYD(T)	ALA f 49-56
1.243,383	1.243,545	0,161	(S)SNICNISCDKF(L)	Ala f 89-99
1.243,383	1.243,566	0,183	(T)WYSLAMAASDI(S)	BLG f 35-45

¹Presente en pooles: A y B; ²presente en pooles: A, D y H; ³presente en pooles: A y D; ⁴presente en pooles: B, D y H.

El análisis de masas se realizó en el rango de m/z de 800 a 2000 Da para el pool A y de 600 a 2000 para los pools B, D y H. En el Pool A se asignaron 11 masas a 32 secuencias teóricas, de las cuales 12 correspondieron a ALA y diez a BLG.

La comparación de las secuencias teóricas de los péptidos presentes en los pools analizados con las secuencias de los péptidos IECA-I depositadas en la base de datos BIOPEP y otras reportadas en bibliografía resultó en tres coincidencias totales y 11 secuencias que coincidieron parcialmente (TABLA 15). El pool H presentó tres secuencias teóricas que se identificaron previamente como péptidos con actividad IECA-I: el fragmento f39-45 (GVSLPEW) de ALA y, los fragmentos f110-116 (VLDTDYK) y f158-164 (ALPMHIR) de BLG. La secuencia GVSLPEW se purificó a partir de un hidrolizado de ALA producido con termolisina (Otte et al., 2007) y presentó una elevada potencia ($IC_{50} = 30 \mu M$). Los péptidos VLDTDYK y ALPMHIR se identificaron en hidrolizados de BLG con enzimas digestivas. ALPMHIR se identificó en un hidrolizado tríptico de BLG (Mullally et al., 1997) y también demostró ser un péptido muy potente ($IC_{50} = 43 \mu M$). VLDTDYK se identificó en un hidrolizado de BLG con pepsina, tripsina y quimotripsina (Pihlanto-Leppälä, Koskinen, Piilola, Tupasela, & Korhonen, 2000) y presentó una potencia menor que los anteriores ($IC_{50} = 976 \mu M$). Otras cinco secuencias teóricas del pool H no reportadas como péptidos IECA-I coincidieron parcialmente con secuencias de péptidos con actividad IECA-I reportados en la literatura (TABLA 15). El pool A presentó una secuencia teórica que solo coincidió parcialmente con la de un péptido IECA-I derivado de ALA reportada por otros autores, mientras que el pool B presentó cinco secuencias (dos derivadas de ALA y tres de BLG) y el pool D una secuencia derivada de BLG que se describen en la TABLA 15.

TABLA 15. Péptidos IECA-I previamente descritos que presentaron homología de estructura con las secuencias teóricas identificadas en el filtrado (2 kDa) del HLS con PepBA.

Secuencia	Fragmento	Secuencia previamente descrita	IC ₅₀ (uM)	Pool	Referencia	BIOPEP ID
(G)GVSLPEW(V)	ALA f 39-45	(G)GVSLPEW(V)	30	H	(Otte et al., 2007)	NR
(G)INYWLAH(K)	ALA f 120-126	(K)VGINYWLAHK(A)	327	A y B	(Pihlanto-Leppälä et al., 2000)	3971
(I)NYWLAH(K)	ALA f121-126	(Y)WLAHK(A)	77	B		NR
(L)VLDTDYK(K)	BLG f 110-116	(L)VLDTDYK(K)	976	H	(Mullally, Meisel, & FitzGerald, 1996)	3979
(K)KYLLF(C)	BLG f 117-121	(K)YLLF(C)	171,8	B		3255
(C)LVRTPE(V)	BLG f 138-143	(C)LVRT(P)	2470	H	(Murray & FitzGerald, 2007)	7808
(T)PEVDDEAL(E)	BLG f 142-149	(R)TPEVDDEALEK(F)	>1000	B	(Power, Fernández, Norris, Riera, & FitzGerald, 2014)	NR
(K)ALKALPM(H)	BLG f 155-161	(K)ALPM(H)	928	B, D y H	(Murakami et al., 2004)	NR
(L)KALPMH(I)	BLG f 157-162	(K)ALPMH(I)	521	B	(Pihlanto-Leppälä et al., 2000)	7489
(K)ALPMHIR(L)	BLG f 158-164	(K)ALPMHIR(L)	42,6	H	(Mullally et al., 1997)	3261
(A)LPMHIR(L)	BLG f 159-164	(K)ALPMHIR(L)				NR
(P)MHIRL(S)	BLG f 161-165	(M)HIRL(S)	1153	H	(Mullally et al., 1996)	3259
(L)PMHIRL(S)	BLG f 160-165	(M)HIRL(S)				

NR= péptido inhibidor de ECA-I no registrado en BIOPEP.

Si bien utilizando SEC se pudieron separar los componentes del FHLS en fracciones con elevados valores CEI y se determinó teóricamente que presentaron secuencias con actividad IECA-I, la identificación de los péptidos responsables de la actividad IECA-I requiere un mayor grado de purificación.

Se realizó la separación del FHLS por SEC-HPLC para intentar mejorar la separación utilizando la columna Superdex Peptide en las condiciones descritas en la sección 3.3.1.2. Previamente, se realizaron corridas en iguales condiciones pero inyectando un volumen mayor de muestra (0,2 y 0,3 mL, no se muestran los resultados) obteniéndose una peor resolución. Los resultados se muestran en la FIGURA 33.

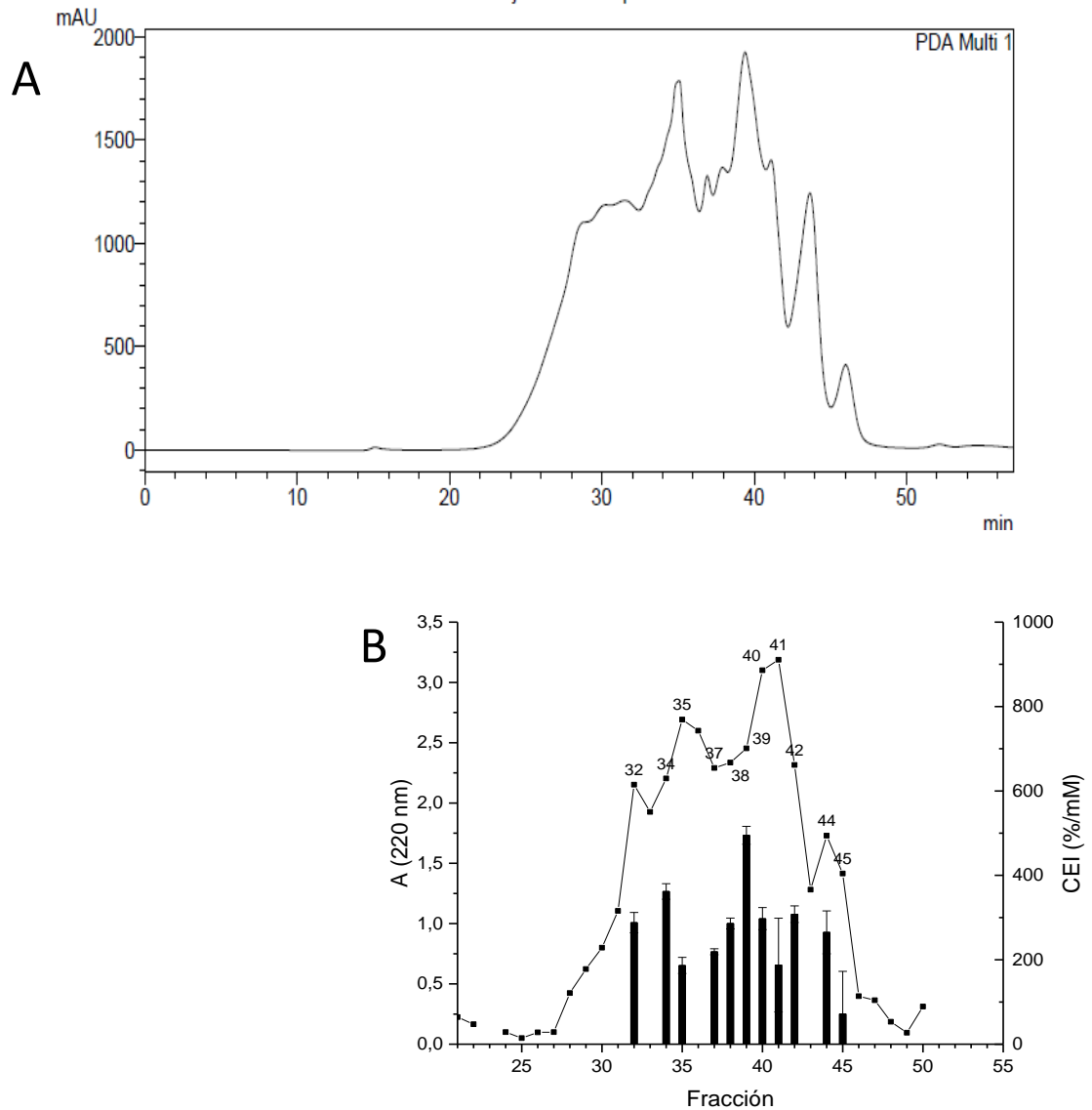


FIGURA 33. SEC-HPLC de 6x FHLS (100 μ L) en columna Superdex Peptide (10 x 300 mm). (A) Perfil de A 220 nm obtenido con LabSolution y (B) perfil de A 220 nm de las fracciones de 1 mL (recolectadas entre los 21 a 50 min de tres corridas independientes realizadas en condiciones semejantes) y CEI (%/mM) de fracciones seleccionadas del cromatograma previamente concentradas (Speedvac).

La separación del FHLS en la columna Superdex Peptide no mostró una mayor eficiencia que la columna Sephadex G-25 debido a los valores de CEI obtenidos (TABLA 16). Además, debido a que el volumen de muestra que puede ser aplicado es menor para la columna Superdex Peptide, las fracciones presentaron muy baja concentración por lo que fue necesario repetir la cromatografía, combinar las fracciones de igual t_R y concentrarlas para tener suficiente material.

Tabla 16. CEI de fracciones seleccionadas de SEC HPLC de FHLS.			
Fracción	IECA-I (%)	Concentración (mM eq)*	CEI (%/mM)
32	75,5 ± 6,4	2,6 x 10 ⁻¹	2,9 x 10 ²
34	55,0 ± 2,8	1,5 x 10 ⁻¹	<u>3,6 x 10²</u>
35	74,5 ± 7,8	4,0 x 10 ⁻¹	1,9 x 10 ²
37	63,5 ± 2,1	2,9 x 10 ⁻¹	2,2 x 10 ²
38	63,0 ± 2,8	2,2 x 10 ⁻¹	2,9 x 10 ²
39	49,5 ± 2,1	1,0 x 10 ⁻¹	<u>5,0 x 10²</u>
40	56,5 ± 4,9	1,9 x 10 ⁻¹	3,0 x 10 ²
41	38,5 ± 19	2,3 x 10 ⁻¹	1,7 x 10 ²
42	55,5 ± 3,5	1,8 x 10 ⁻¹	3,1 x 10 ²
44	22,0 ± 4,2	8,3 x 10 ⁻²	2,7 x 10 ²
45	1,0 ± 1,4	1,4 x 10 ⁻²	7,1 x 10 ¹

* Concentración en el ensayo de actividad IECA-I.

4.3.1.2 Purificación de péptidos IECA-I a partir de hidrolizado de ALA y BLG aisladas

Debido a la complejidad del HLS y FHLS se prepararon hidrolizados de las dos proteínas mayoritarias del LS para purificar los péptidos IECA-I a partir de ellos. Se utilizaron soluciones de ALA y BLG (5 mg/mL) en buffer borato de sodio 0,1 M pH 9,2 se trataron en iguales condiciones a las que se preparó el HLS (relación E/S, pH, temperatura y tiempo de hidrólisis). A partir de los hidrolizados de ALA y BLG se obtuvieron los correspondientes filtrados de ultrafiltración con membranas de corte en 2 kDa. Tanto los hidrolizados como los filtrados correspondientes se separaron por SEC-HPLC y los cromatogramas obtenidos se muestran en la FIGURA 34.

El HALA presentó una actividad IECA-I de 84,5 ± 0,7 % (CEI= 175,0 ± 1,5 %/mM) y se resolvió en cuatro pooles (HA SEC1-4, FIGURA 34A) registrándose actividad IECA-I en todos ellos con CEI superiores al del HALA (TABLA 17). La fracción HA SEC2 (tamaño entre 1700 y 500 Da) mostró ser la fracción más potente debido a que presentó el mayor CEI (470 %/mM).

A su vez, el FHALA presentó una actividad IECA-I de 63,0 ± 2,8 % (CEI= 682 ± 30 %/mM) y se resolvió en tres pooles (FA SEC1-3, FIGURA 34B) que presentaron actividad IECA-I (TABLA 17). El pool más potente fue FA SEC1 que presentó componentes en el rango de tamaño de 1000 a 700 Da que coincidieron con los presentes en el pool HA SEC2. El CEI de FA SEC1 fue superior a 1500 %/mM y comparado con el correspondiente al HA SEC2 fue al menos tres veces mayor reafirmando la utilidad del paso de ultrafiltración como etapa inicial de fraccionamiento de los hidrolizados.

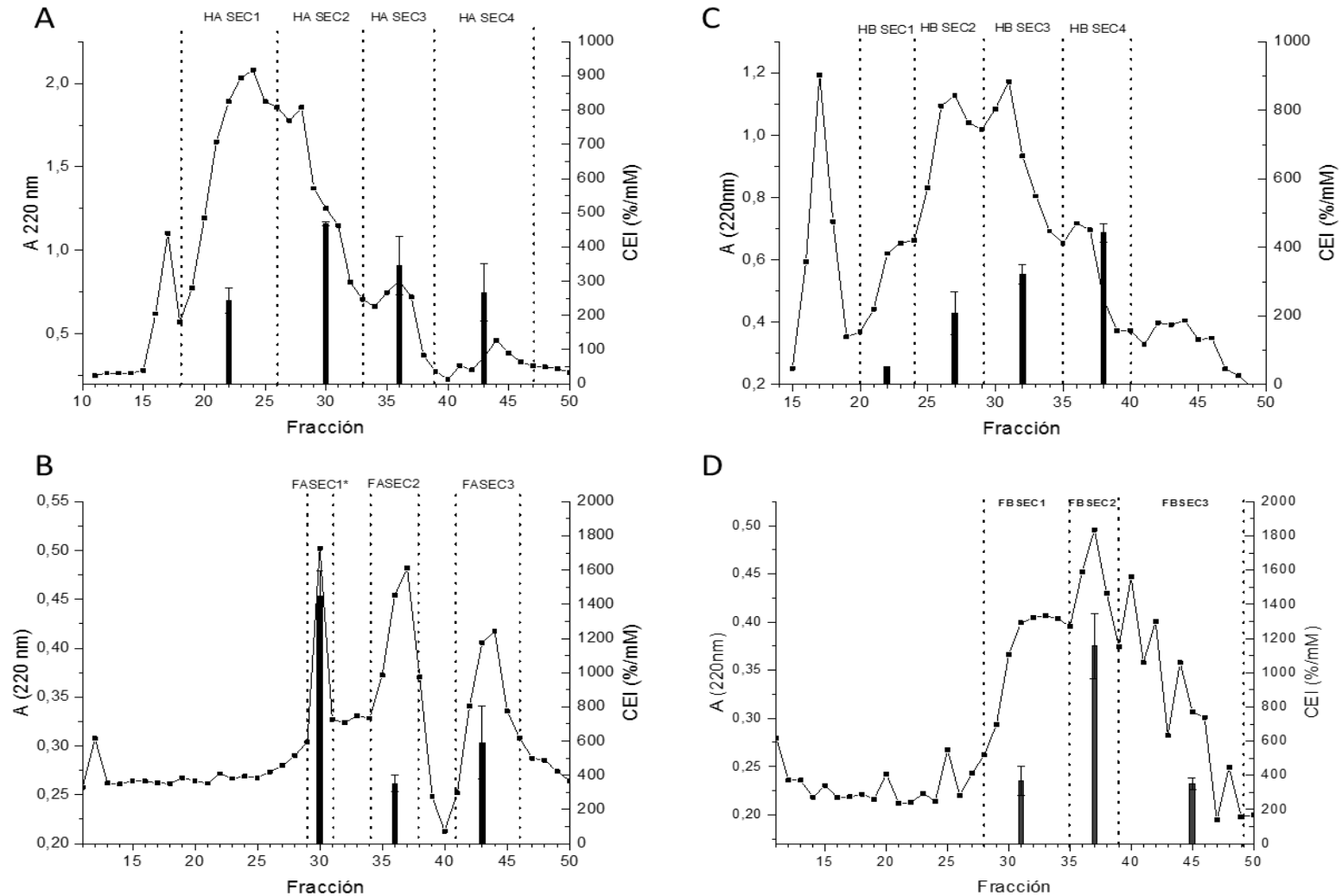


FIGURA 34. SEC-HPLC de hidrolizados de ALA y BLG aisladas y CEI de los pools de fracciones de cada cromatografía. (A) Perfil de HALA y CEI de los pools: HA SEC1 (fracciones 18-26); HA SEC2 (fracciones 27-33), HA SEC 3 (fracciones 34-39) y HA SEC4 (fracciones 40-47). (B) Perfil de FHALA y CEI de los pools: FHA SEC1 (fracciones 29-31); FHA SEC2 (fracciones 34-38) y FHA SEC 3 (fracciones 41-46). (C) Perfil de HBLG y CEI de los pools: HB SEC1 (fracciones 20-24); HB SEC2 (fracciones 25-29), HB SEC 3 (fracciones 30-35) y HB SEC4 (fracciones 36-40). (D) Perfil de FHBLG y CEI de los pools: FHB SEC1 (fracciones 28-35); FHB SEC2 (fracciones 36-39) y FHB SEC 3 (fracciones 40-49).

El HBLG presentó una actividad IECA-I del $80,0 \pm 1,4$ % (CEI= $95,0 \pm 1,7$ %/mM) y como en el HALA la separación por SEC HPLC de HBLG resultó en cuatro pools (HB SEC 1-4, FIGURA 34C) con actividad IECA-I superior al de la muestra inicial (TABLA 17). El pool HB SEC-4 fue la fracción con la mayor actividad IECA-I ($47,0 \pm 2,8$ % y CEI= 440 %/mM), pool compuesto por los péptidos de tamaño menor a 300 Da.

El FHBLG, con actividad IECA-I del $74,0 \pm 8,5$ % y CEI= 301 ± 34 %/mM se separó en tres pools (FB SEC1-3, FIGURA 34D) con actividad IECA-I. El pool FB SEC2 fue el pool que presentó la mayor actividad IECA-I (CEI de 1200 %/mM). Este pool está compuesto por péptidos de tamaño menor a 360 Da y su valor de CEI triplica el valor obtenido para HB SEC4.

TABLA 17. Propiedades de fracciones seleccionadas de SEC HPLC de HALA, FHALA, HBLG y FHBLG.					
Muestra	Fracciones	Masa (Da)	IECA-I (%)	Concentración (mM) ^a	CEI (%/mM)
HA-SEC1	18-26	> 1700	$32,5 \pm 4,9$	$1,3 \times 10^{-1}$	$2,4 \times 10^2$
HA-SEC2	27-33	1400-500	$59,5 \pm 0,7$	$1,3 \times 10^{-1}$	$4,7 \times 10^2$
HA-SEC3	34-39	400-180	$25,5 \pm 6,4$	$7,4 \times 10^{-2}$	$3,5 \times 10^2$
HA-SEC4	40-47	< 200	$9,0 \pm 2,8$	$3,4 \times 10^{-2}$	$2,7 \times 10^2$
FA-SEC1	29-31	1000-700	$43,0 \pm 4,2$	$< 3,0 \times 10^{-2}$ ^b	$> 1,5 \times 10^3$
FA-SEC2	34-38	400-200	$15,5 \pm 2,1$	$4,4 \times 10^{-2}$	$3,5 \times 10^2$
FA-SEC3	41-46	< 200	$17,5 \pm 6,4$	$3,0 \times 10^{-2}$	$5,9 \times 10^2$
HB-SEC1	20-24	> 2300	$2,0 \pm 0,1$	$3,8 \times 10^{-2}$	$5,3 \times 10^1$
HB-SEC2	25-29	2000-1000	$41,5 \pm 6,4$	$1,8 \times 10^{-1}$	$2,1 \times 10^2$
HB-SEC3	30-35	800-350	$66,0 \pm 2,8$	$2,0 \times 10^{-1}$	$3,2 \times 10^2$
HB-SEC4	36-40	< 300	$47,0 \pm 2,8$	$1,1 \times 10^{-1}$	$4,4 \times 10^2$
FB-SEC1	28-34	1200-400	$15,5 \pm 3,5$	$4,2 \times 10^{-2}$	$3,7 \times 10^2$
FB-SEC2	35-39	< 360	$43,0 \pm 7,1$	$3,7 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^3$
FB-SEC3	40-49	< 200	$14,0 \pm 1,4$	$4,0 \times 10^{-2}$	$3,5 \times 10^2$

^aConcentración en el ensayo de actividad IECA-I expresada en mM equivalentes de valina.
^bLa concentración de esta fracción fue menor que el límite de detección del ensayo ($4,3 \times 10^{-1}$ mM) y por lo tanto la concentración en el ensayo de actividad IECA-I inferior a $3,0 \times 10^{-2}$ mM.
 La denominación de las muestras se corresponde a la utilizada en la FIGURA 34.

Las separaciones de los hidrolizados, utilizando SEC, resultaron en fracciones con mayor CEI que las muestras iniciales pero esta cromatografía no resultó adecuada en la práctica. Las fracciones con mayor CEI presentaron muy baja concentración peptídica (aun luego de concentrarlas) con una composición compleja que dificultó los siguientes pasos de purificación necesarios para la identificación de los péptidos responsables de la actividad IECA-I.

4.3.2 Extracción en fase sólida

El fraccionamiento de péptidos en base a su hidrofobicidad es una metodología muy empelada por su efectividad. Además la extracción en fase sólida tiene la ventaja de ser un método de alta capacidad y que permite la elución con diferentes concentraciones de modificador orgánico de forma de obtener eluidos con componentes de hidrofobicidad creciente.

El HLS se fraccionó en función de la hidrofobicidad de sus componentes, utilizando un cartucho de extracción en fase sólida C₁₈ (SPE C₁₈). La elución se realizó en cuatro pasos aumentando la concentración de ACN del eluyente a 10, 30, 60 y 100 % (v/v). Las fracciones obtenidas se analizaron por SEC-HPLC utilizando una columna Superdex (como se indicó en la sección 3.2.4) y se determinó su actividad IECA-I y concentración peptídica.

Los perfiles de SEC-HPLC de las fracciones del SPE C₁₈ se muestran en la FIGURA 35. Como puede apreciarse, la composición de cada fracción fue diferente. En la fracción no retenida (NR), es decir la que contenía los componentes más hidrofílicos, se pudieron observar componentes de masa molecular en el rango de 1000-3000 Da y otros componentes de masa menor a 200 Da. En el eluido con 10 % ACN (fracción E1) se observó principalmente la presencia de componentes de masa molecular menor a 200 Da. Los componentes que eluyeron con 30 % de ACN (fracción E2) comprendieron un amplio rango de masa molecular siendo la fracción más compleja. Probablemente, esto se deba a que la mayoría de las proteínas y péptidos retenidos en una resina C₁₈ normalmente eluyen con 30 % de ACN. Los péptidos muy hidrofóbicos requieren una concentración mayor de ACN para eluir, como en el caso de los componentes que eluyeron en E3 y E4 (FIGURA 35). De acuerdo al perfil peptídico de E3 y E4 los componentes presentaron un tamaño molecular inferior a 1000 Da por lo que se trataría de péptidos pequeños (menos de 10 residuos) con un alto grado de hidrofobicidad.

Luego de concentrar y eliminar el ACN de las fracciones del SPE se evaluó su actividad IECA-I y concentración peptídica para calcular el correspondiente CEI. Todas las fracciones ensayadas presentaron actividad IECA-I (TABLA 18) pero notoriamente la fracción E4 fue la que presentó un mayor CEI. Esta fracción contenía los componentes del HLS con mayor carácter hidrofóbico y menor tamaño (menores de 1000 Da). Los di o tripéptidos o los péptidos de hasta diez residuos que contienen residuos hidrofóbicos en cualquiera de las tres posiciones del extremo C-terminal han demostrado ser péptidos con alto potencial IECA-I (Iwaniak et al., 2014). Considerando las características de los componentes de E4 y que esta fracción presenta una alta actividad IECA-I que corresponde a una mezcla de péptidos con baja concentración es probable que los péptidos presentes sean péptidos IECA-I potentes.

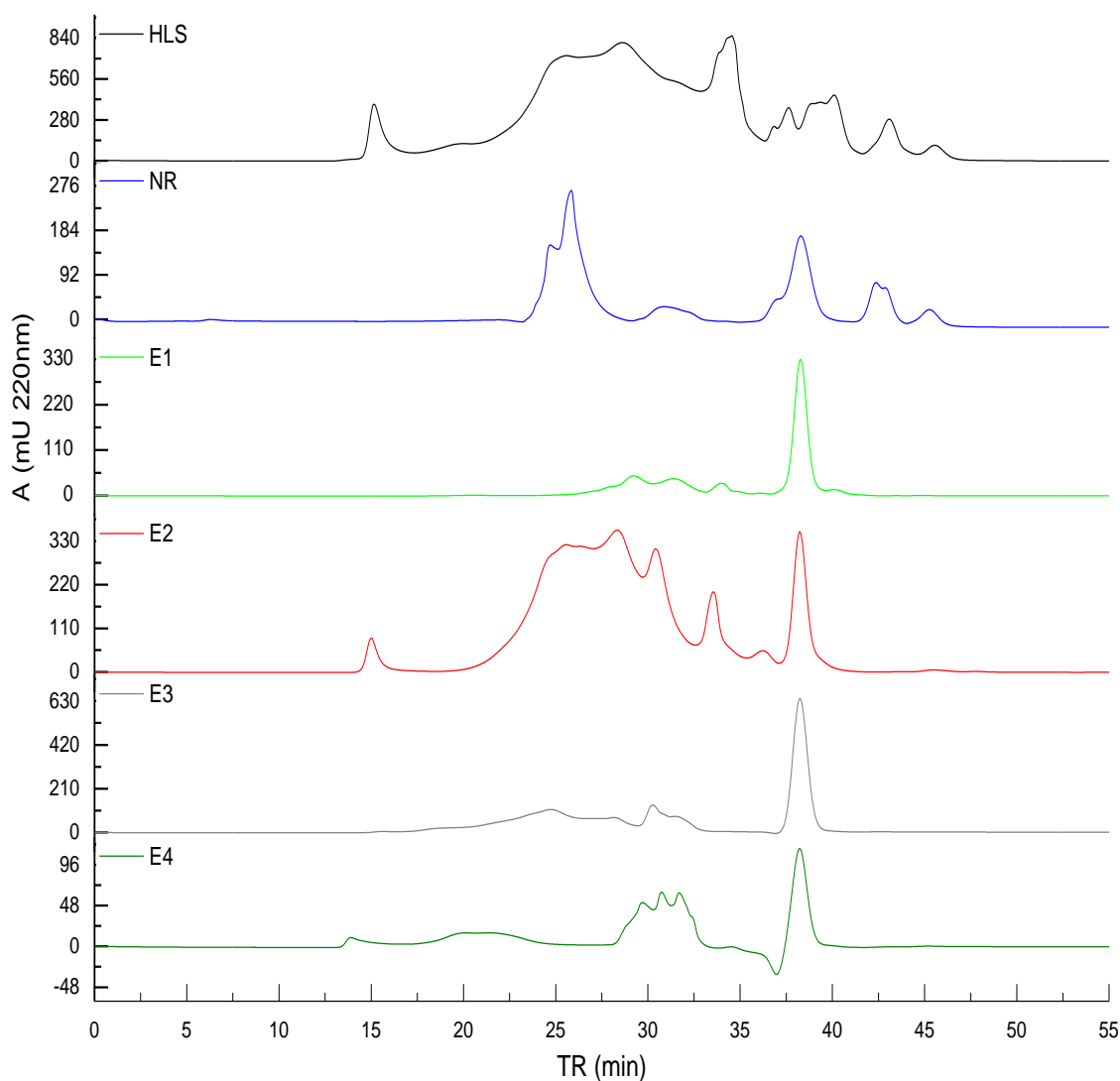


FIGURA 35. SEC-HPLC en columna Superdex Peptide del HLS y las fracciones de SPE con cartucho C18. Se inyectó: 100 μL de HLS; 300 μL de NR (fracción no retenida por el cartucho); 100 μL de E1 y E2 (fracciones eluidas con soluciones de ACN en agua al 10 y 30 % respectivamente) y 200 μL de E3 y E4 (eluidas con 60 y 100 % de ACN respectivamente).

TABLA 18. CEI de HLS y fracciones de extracción en fase sólida (Cartucho C18) de HLS.			
Fracción	IECA-I (%)	Concentración (mM eq)*	CEI (%/mM)
HLS	95,5 \pm 2,1	7,9	12
NR	97,5 \pm 3,5	1,2	83
E1	ND	ND	ND
E2	94,5 \pm 2,1	2,6	36,5
E3	92,0 \pm 1,4	3,9 $\times 10^{-1}$	236
E4	80,0 \pm 1,4	8,0 $\times 10^{-2}$	1000

NR= fracción no retenida por el cartucho; E1, E2, E3 y E4 fracciones eluidas con soluciones de ACN en agua al 10, 30, 60 y 100 % de respectivamente. ND= no determinado. Las fracciones fueron concentradas por evaporación al vacío antes de realizar los controles. * Concentración en el ensayo de actividad IECA-I expresada en mM equivalentes de valina.

4.3.3 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP HPLC)

4.3.3.1 Purificación de péptidos IECA-I a partir de HLS

El HLS se aplicó a una columna de SPE C₁₈ como se describe en la sección 3.4.3. El eluido de SPE (IECA-I= 77,5 ± 3,5 %) se analizó por RP-HPLC utilizando una columna Viva C18 (como se indicó en la sección 3.4.3). El gradiente de ACN entre 10 y 30 % ocupó 60 min para permitir la separación de los componentes de E1. Las fracciones obtenidas se concentraron por eliminación del solvente y, se determinó su actividad IECA-I y su concentración peptídica. Como se puede observar en la FIGURA 36A, la muestra presentó una composición muy compleja con más de 60 picos que contienen péptidos con diferente hidrofobicidad que eluyeron con el gradiente de ACN entre 10 y 30 %(v/v).

En la FIGURA 36B se muestra el cromatograma de las fracciones colectadas de 0,5 mL y como gráfico de barras el CEI (%/mM) de las 11 fracciones que se seleccionaron debido a que correspondieron a los máximos de los picos más importantes del cromatograma. Todas las fracciones seleccionadas presentaron actividad IECA-I que evidenció la presencia de diversos péptidos con actividad IECA-I. Las fracciones 29, 57 y 67 fueron las que presentaron mayores CEI, seguidas de las fracciones 33, 36 y 51 (TABLA 19).

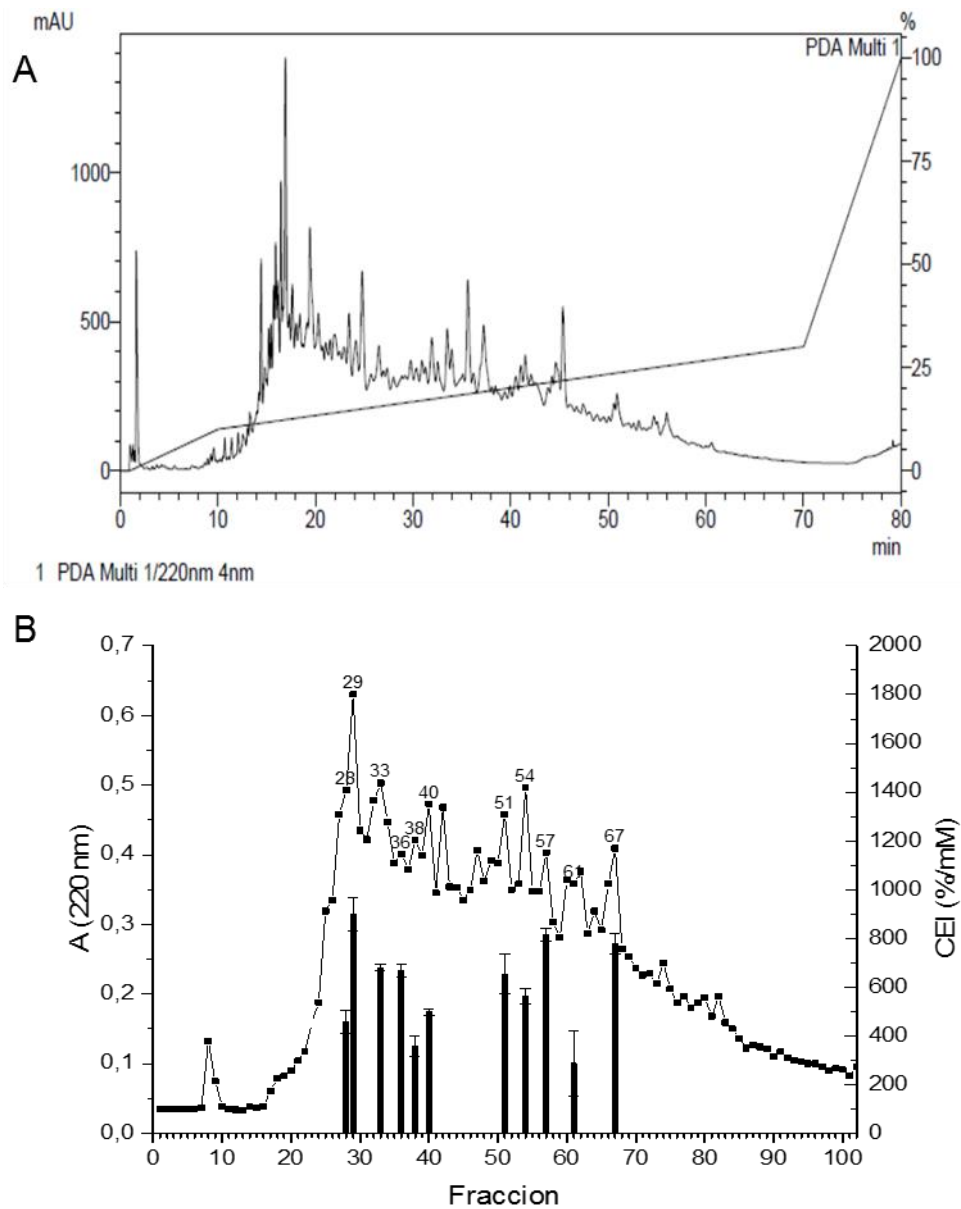


FIGURA 36. RP-HPLC (en columna Viva C18 (Restek) de HLS previamente fraccionado por extracción en fase sólida. (A) Cromatograma de absorbancia a 220 nm en función de tiempo de retención y gradiente de concentración de ACN (en *eje* y derecho) generado por el software Labsolution; (B) de Perfil de A 220 nm de las fracciones colectadas de 1,0 mL. EL CEI (%/mM) de las fracciones (previamente concentradas con Speedvac) seleccionadas del cromatograma se muestran como barras. Las fracciones seleccionadas se etiquetaron con el número de la fracción sobre los picos.

TABLA 19. CEI de las fracciones de RP-HPLC de HLS.			
Fracción	IECA-I (%)	Concentración* (mM)	CEI (%/mM)
28	42,0 ± 2,1	9,2 x 10 ⁻²	(4,6 ± 0,5) x 10 ²
29	55,0 ± 2,1	6,1 x 10 ⁻²	<u>(9,0 ± 0,7) x 10²</u>
33	39,5 ± 0,4	5,8 x 10 ⁻²	(6,8 ± 1,2) x 10 ²
36	50,5 ± 1,1	7,6 x 10 ⁻²	(6,7 ± 0,3) x 10 ²
38	24,0 ± 1,4	6,7 x 10 ⁻²	(3,6 ± 0,4) x 10 ²
40	29,5 ± 0,4	5,9 x 10 ⁻²	(5,0 ± 0,1) x 10 ²
51	34,0 ± 2,1	5,2 x 10 ⁻²	(6,5 ± 0,8) x 10 ²
54	38,5 ± 1,1	6,8 x 10 ⁻²	(5,6 ± 0,3) x 10 ²
57	43,0 ± 0,7	5,3 x 10 ⁻²	<u>(8,2 ± 0,3) x 10²</u>
61	16,5 ± 3,9	5,8 x 10 ⁻²	(2,9 ± 1,4) x 10 ²
67	41,5 ± 1,1	5,3 x 10 ⁻²	<u>(7,8 ± 0,4) x 10²</u>

* Concentración en el ensayo de actividad IECA-I expresada en mM equivalentes de valina.

4.3.3.2 Purificación de péptidos IECA-I a partir de hidrolizados de ALA y BLG aisladas

El FHALA se analizó por RP-HPLC utilizando una columna Viva C18 (como se indicó en la sección 3.4.3). Se utilizó un gradiente de ACN entre 0 y 100 % ocupó 100 min para permitir la separación de los componentes del FHALA. Las fracciones obtenidas se concentraron por eliminación del solvente y, se determinó su actividad IECA-I y su concentración peptídica. Como se puede observar en la FIGURA 37A, la muestra presentó una composición compleja con más de 30 picos que contienen péptidos con diferente hidrofobicidad. Los seis picos más importantes salieron durante el gradiente de 0 a 30 % (v/v) de ACN mientras que en el resto del gradiente se observaron múltiples picos pequeños.

En la FIGURA 37B se muestra el cromatograma de las fracciones colectadas de 1 mL y como gráfico de barras el CEI (%/mM) de las trece fracciones que fueron seleccionadas debido a que correspondieron a los máximos de los picos del cromatograma. Diez de las fracciones seleccionadas presentaron actividad IECA-I mayor al 15 %. Las fracciones 49 y 28 con CEI de (2,2 y 1,8) x 10³ %/mM respectivamente, fueron las más potentes. Seguidas de las fracciones 37, 4, 70 y 22 con CEI (1,5 -1,2) x 10³ %/mM (TABLA 20). La distribución de la actividad IECA-I evidenció la presencia de péptidos con actividad IECA-I diversos y con diferente carácter hidrofóbico. Las fracciones más potentes eluyeron durante el gradiente de 0 a 30 % de ACN.

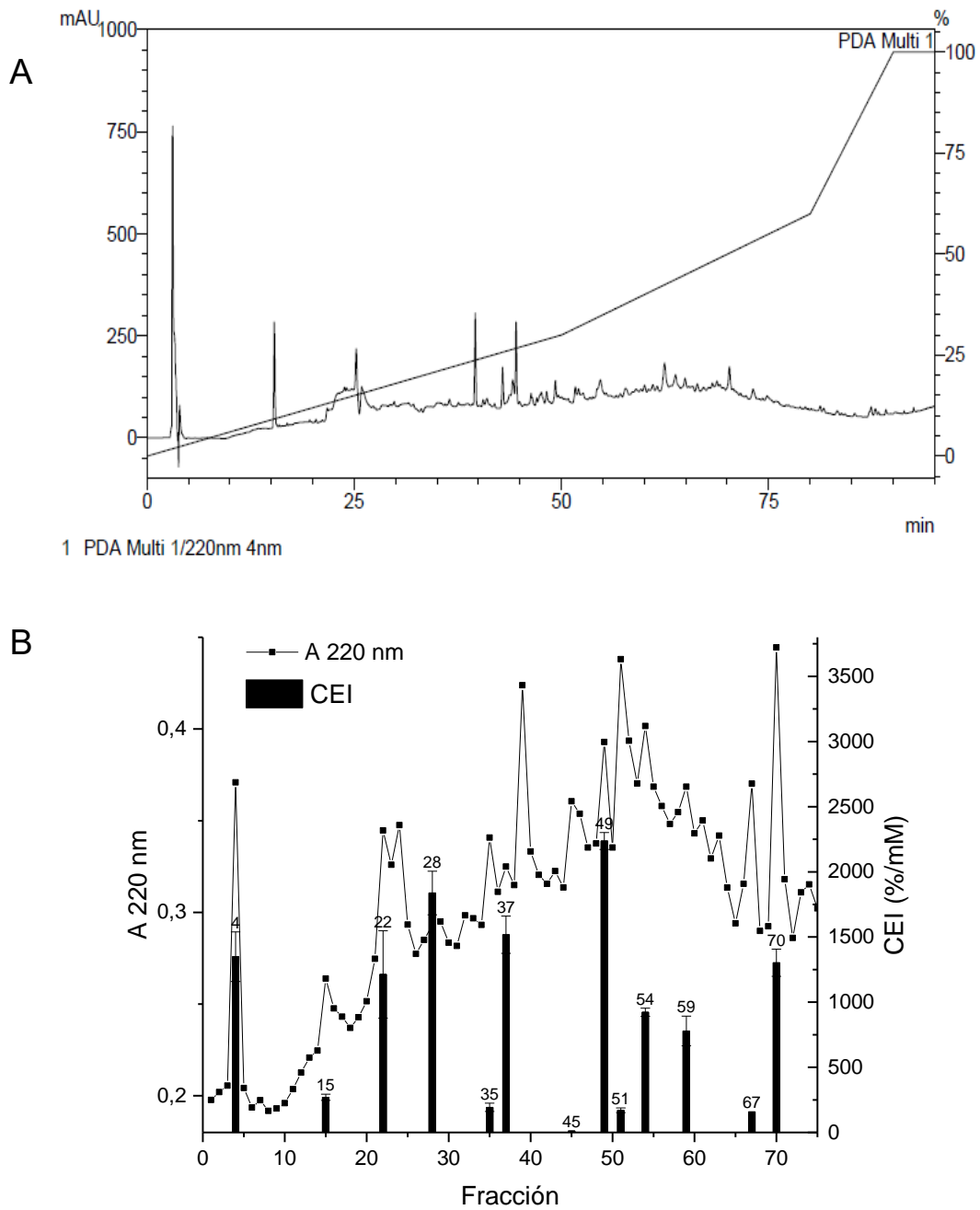


FIGURA 37. Cromatograma de RP-HPLC (en columna Viva C18 (Restek) de FHALA (A); Perfil de A 220 nm de las fracciones colectadas de 1,0 mL. EL CEI (%/mM) de las fracciones (previamente concentradas con Speedvac) seleccionadas del cromatograma se muestran como barras (B).

TABLA 20. CEI de las fracciones de RP-HPLC de FHALA.			
Fracción	IECA-I	Concentración ^a (mM)	CEI (%/mM)
4	40,0 ± 5,7	<3,0 x 10 ^{-2,b}	>(1,3 ± 0,2) x 10 ³
15	64,0 ± 5,7	2,4 x 10 ⁻¹	(2,7 ± 0,2) x 10 ²
22	46,0 ± 12,7	3,8 x 10 ⁻²	(1,2 ± 0,3) x 10 ³
28	54,5 ± 4,9	<3,0 x 10 ^{-2,b}	>(1,8 ± 0,2) x 10 ³
35	47,5 ± 7,8	2,5 x 10 ⁻¹	(1,9 ± 0,3) x 10 ²
37	45,0 ± 4,2	<3,0 x 10 ^{-2,b}	>(1,5 ± 0,1) x 10 ³
45	2,0 ± 0,1	1,7 x 10 ⁻¹	(1,2 ± 0,1) x 10 ¹
49	72,5 ± 2,1	3,3 x 10 ⁻²	(2,2 ± 0,1) x 10 ³
51	13,0 ± 1,4	7,6 x 10 ⁻²	(1,7 ± 0,2) x 10 ²
54	40,5 ± 0,7	4,5 x 10 ⁻²	(9,2 ± 0,3) x 10 ²
59	29,0 ± 4,2	3,7 x 10 ⁻²	(7,8 ± 1,1) x 10 ²
67	6,0 ± 0,1	3,8 x 10 ⁻²	(1,6 ± 0,1) x 10 ²
70	58,5 ± 3,5	4,1 x 10 ⁻²	(1,3 ± 0,1) x 10 ³

^a Concentración en el ensayo de actividad IECA-I expresada en mM equivalentes de valina.
^b La concentración de esta fracción fue menor que el límite de detección del ensayo (4,3 x 10⁻¹ mM) y por lo tanto la concentración en el ensayo de actividad IECA-I inferior a 3,0 x 10⁻² mM.

El FHBLG fue analizado por RP-HPLC al igual que el FHALA. Se utilizó un gradiente de ACN entre 0 y 100 % que ocupó 70 min. Las fracciones obtenidas fueron concentradas por eliminación del solvente y, se determinó su actividad IECA-I y su concentración peptídica. Como se puede observar en la FIGURA 38A, la muestra presentó una composición compleja con más de 30 picos que contienen péptidos con diferente hidrofobicidad. Los siete picos más importantes eluyeron durante el gradiente de 0 a 30 % (v/v) de ACN mientras que en el resto del gradiente se observaron múltiples picos más pequeños.

En la FIGURA 38B se muestra el cromatograma de las fracciones colectadas de 1 mL y como gráfico de barras el CEI (%/mM) de las diecisiete fracciones que fueron seleccionadas debido a que correspondieron a los máximos de los picos del cromatograma. 11 de estas fracciones presentaron actividad IECA-I. Las fracciones más potentes fueron la 46, 57, 40, 26 y 49 con CEI de (2,3; 2,2; 2,0; 1,8 y 1,7) x 10³ %/mM respectivamente. Seguidas de las fracciones 54, 76 y 15 con CEI (1,4 -1,3) x 10³ %/mM (TABLA 21). A pesar de que la actividad IECA-I fue observada en fracciones eluidas con diferente concentración de ACN indicando un diferente grado de hidrofobicidad. Durante el gradiente de 30 a 60 % de ACN (v/v) eluyeron la mayor parte de las fracciones más potentes indicando un alto grado de hidrofobicidad.

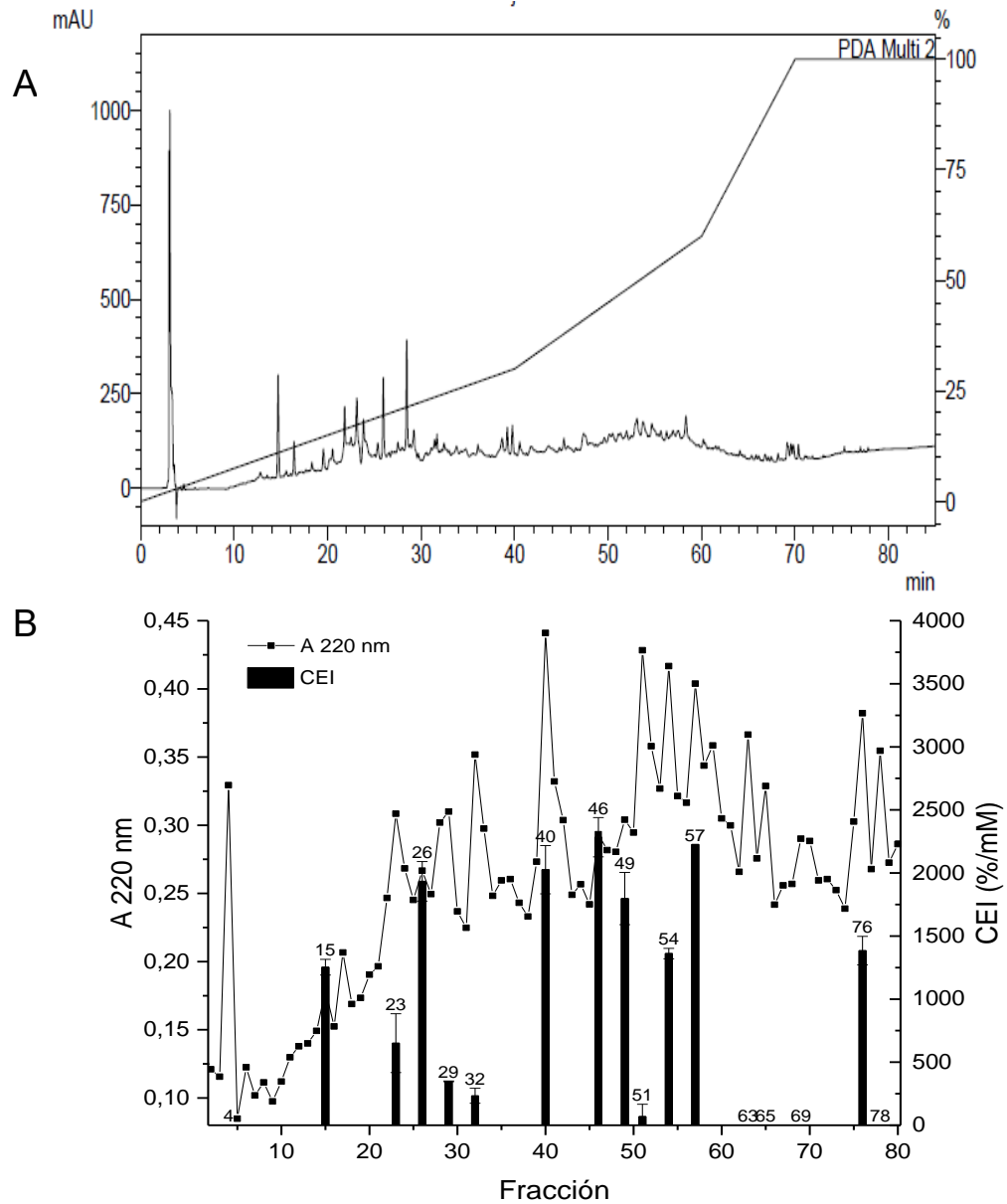


FIGURA 38. Cromatograma de RP-HPLC (en columna Viva C18 (Restek) de FHBLG (A); Perfil de A 220 nm de las fracciones colectadas de 1,0 mL. EL CEI (%/mM) de las fracciones (previamente concentradas con Speedvac) seleccionadas del cromatograma se muestran como barras (B).

TABLA 21. CEI de las fracciones de RP-HPLC de FHBLG.			
Fracción	IECA-I	Concentración* (mM)	CEI (%/mM)
4	0	$1,6 \times 10^{-1}$	0
15	$42,5 \pm 2,1$	$3,4 \times 10^{-2}$	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^3$
23	$33,5 \pm 12,0$	$5,1 \times 10^{-2}$	$(6,5 \pm 2,3) \times 10^2$
26	$78,5 \pm 6,4$	$4,0 \times 10^{-2}$	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^3$
29	$81,5 \pm 0,7$	$2,3 \times 10^{-1}$	$(3,5 \pm 0,1) \times 10^2$
32	$50,0 \pm 12,7$	$2,1 \times 10^{-1}$	$(2,3 \pm 0,6) \times 10^2$
40	$67,5 \pm 6,4$	$3,3 \times 10^{-2}$	$(2,0 \pm 0,2) \times 10^3$
46	$83,0 \pm 5,7$	$3,6 \times 10^{-2}$	$(2,3 \pm 0,2) \times 10^3$
49	$67,5 \pm 7,8$	$3,8 \times 10^{-2}$	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^3$
51	$2,5 \pm 0,5$	$3,6 \times 10^{-2}$	$(6,9 \pm 0,3) \times 10^1$
54	$47,0 \pm 1,4$	$3,4 \times 10^{-2}$	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^3$
57	$89,0 \pm 0,1$	$4,0 \times 10^{-2}$	$(2,2 \pm 0,1) \times 10^3$
63	0	$3,5 \times 10^{-2}$	0
65	0	$3,6 \times 10^{-2}$	0
69	0	$3,4 \times 10^{-2}$	0
76	$52,0 \pm 0,5$	$3,8 \times 10^{-2}$	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^3$
78	0	$3,3 \times 10^{-2}$	0

* Concentración en el ensayo de actividad IECA-I expresada en mM equivalentes de valina.

Los diferentes métodos separativos utilizados permitieron fraccionar a los componentes de los hidrolizados de LS, ALA y BLG en fracciones con actividad IECA-I, menos complejas y más potentes. Sin embargo, la baja concentración de las fracciones purificadas hizo difícil la combinación de los métodos, para la evaluación de la composición y la purificación más exhaustiva, necesaria para la identificación de los péptidos responsables de la actividad IECA-I.

4.4 Purificación por cromatografía de afinidad de péptidos IECA-I a partir de hidrolizados de ALA

4.4.1 Purificación de las peptidasas del extracto crudo de frutos de *B antiacantha* (ECBA)

Estudios previos (Santos, De Freitas, Deschamps, & Biavatti, 2009) mostraron que los frutos maduros de *B antiacantha* presentan un abundante contenido de componentes no proteicos como: carbohidratos (44 % m/m), lípidos (18,2 % m/m) y un contenido de compuestos fenólicos totales (1,5 mg/g de fruto fresco) similar al del ananá. Debido a que las peptidasas son el principal componente de la fracción proteica se realizó una cromatografía de intercambio iónico para eliminar los compuestos no proteicos presentes en el ECBA que podrían interferir en los métodos de identificación de los péptidos que se emplearon en esta parte del trabajo. La elección del intercambiador catiónico así como las condiciones de adsorción y elución de la muestra se basaron en resultados previos de Vallés & Cantera (2015). En la FIGURA 39, se muestran los espectros UV del ECBA y las diferentes fracciones obtenidas del intercambio. Tanto el ECBA como el NR presentaron absorbancia en un amplio rango de longitudes de onda (220-360 nm) debido al alto contenido de compuestos fenólicos (Santos et al., 2009). En los eluidos (E4 a E7) se puede observar un pico a 280 nm, característico de proteínas y la pérdida de las especies que absorben a longitudes de onda en el rango de 300-360 nm. Mientras que en el NR la proporción de proteínas a otras especies es favorable a los últimos.

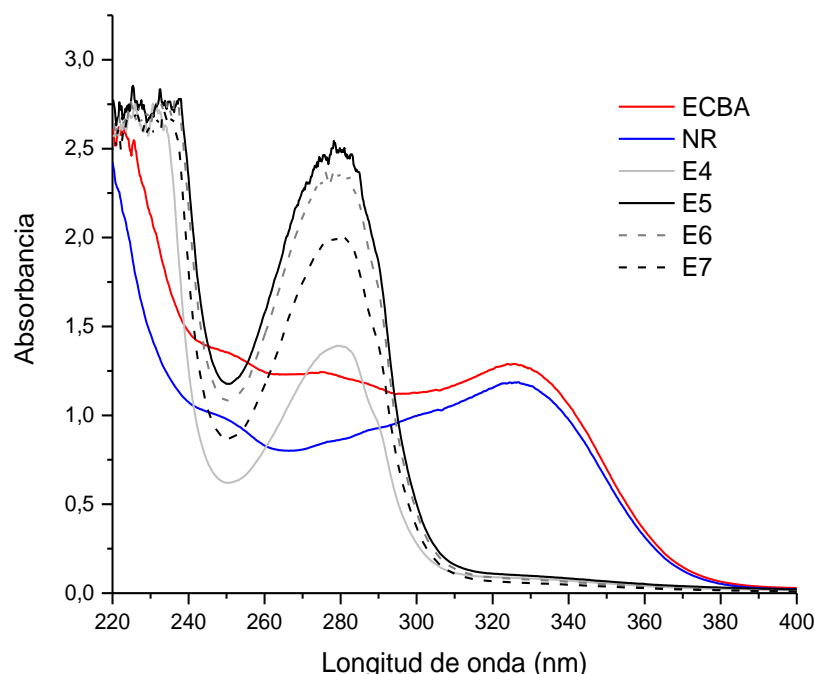


FIGURA 39. Espectros UV de ECBA (dilución 1/10) y las fracciones NR (dilución 1/10) y E4-7 (sin diluir) del intercambio iónico de ECBA.

Como puede apreciarse en la TABLA 22, solo se detectó actividad proteolítica en los eluidos y la actividad específica es diferente según el eluido, indicando diferentes grados de purificación de las enzimas proteolíticas.

Tabla 22. Evaluación de la purificación por intercambio iónico del ECBA.			
Muestra	Proteínas (mg/mL)	Actividad enzimática (UE/mL)	AE (UE/mg)
ECBA	0,58 ± 0,08	20,6 ± 0,9	34,9
NR	ND	ND	ND
E4	0,31 ± 0,05	9,6 ± 0,2	25,3
E5	0,70 ± 0,21	27,8 ± 1,5	34,3
E6	0,35 ± 0,10	28,7 ± 1,2	70,0
E7	0,27 ± 0,04	20,7 ± 1,0	71,4
ND= no detectado; AE= actividad específica			

Luego de realizar varias cromatografías en las mismas condiciones, se unificaron los eluidos y se concentraron por ultrafiltración. Finalmente se obtuvo una fracción, a la que se llamó extracto purificado de *B antiacantha* (EPBA), cuya actividad enzimática fue de 192,4 ± 0,9 UE/mL y su actividad específica de 40,2 UE/mg de proteína con la que se preparó el HALA.

4.4.2 Hidrólisis de ALA con EPBA

El HALA obtenido con EPBA en las condiciones indicadas en materiales y métodos, presentó un DH del 13,4 ± 1,1 %. Este valor de DH no es significativamente diferente al obtenido para el HALA preparado con el PepBA (DH= 15,1 ± 2,4 %). Esto indicaría que el proceso de purificación por intercambio iónico no modificó el comportamiento de las peptidasas en la hidrólisis de ALA. La actividad IECA-I del FHALA previamente concentrado por SPE fue del 90,5 ± 0,7 % y presentó una concentración peptídica de 3,43 ± 0,16 mM.

4.4.3 Purificación por cromatografía de afinidad

Se prepararon micro columnas de afinidad con ECA-I-I inmovilizada y se ajustó un protocolo de purificación de los péptidos IECA-I presentes en el FHALA.

TABLA 23. Inmovilización de ECA-I-I en NHS-Sepharose.			
Muestra	Concentración de proteínas ¹ (µg/mL)	Volumen (mL)	Proteína total (µg)
Aplicada	157,0 ± 12,6	0,200	31,4
Sobrenadante	50,3 ± 6,0	0,200	10,6
Lavados	10,3 ± 2,1	0,200	2,06
¹ Concentración de proteínas determinada por el método de Bradford utilizando BSA como estándar.			

De acuerdo a los datos del control de la concentración de proteínas de la muestra aplicada a la columna de Sepharose-NHS activada y, del sobrenadante y lavados luego de la inmovilización

(TABLA 23), se determinó que el rendimiento de inmovilización fue del 60 %. El ligando (ECA-I) fue preparado a una concentración de 0,9 mg/mL (de acuerdo al contenido de proteínas indicado por el fabricante y teniendo en cuenta que se trabajó con la enzima purificada). Los controles de proteína inmovilizada (TABLA 23), realizados con el método de Bradford, dieron como resultado una concentración notoriamente más baja que la considerada. Probablemente esto se deba a que el método de Bradford es dependiente de la composición aminoacídica de la proteína. Considerando que se inmovilizó el 60 % de la proteína aplicada (180 µg ECA-I) se habría inmovilizado 108 µg de ECA-I (0,9 nmoles).

La cromatografía de afinidad ha sido poco empleada para la purificación de péptidos IECA-I. Se han reportado algunos trabajos en los que se prepararon derivados con ECA-I inmovilizada a través de sus grupos amino con agarosa (4BCL) glioxil activada (Megías et al., 2006), agarosa (Sephacrose) epoxy activada y Affi Gel 15 (Bio-Rad) un tipo de agarosa activada con un éster de N-hidroxisuccinimida (Thevananther & Brecher, 1999) o adsorbida en microesferas magnéticas de agarosa (Lan et al., 2015). En todos los casos los derivados con ECA-I inmovilizada/adsorbida fueron efectivos para la captura de péptidos IECA-I.

4.4.4 Identificación de secuencias de péptidos IECA-I

Se detectaron varios componentes en las fracciones eluidas de la columna de afinidad (+ECA-I) y columna-control (-ECA-I) cuyas secuencias se identificaron realizando búsquedas en las bases de datos. Se realizó una búsqueda en una base de datos local utilizando la secuencia de ALA bovina como proteína precursora de los péptidos y paralelamente se realizó una búsqueda en bases públicas donde las masas se compararon con todas las secuencias depositadas (Ver Anexo2). En la TABLA 24 se muestran las secuencias de los péptidos capturados por la columna de afinidad columna de afinidad (+ECA-I). Las secuencias que también se identificaron en la muestra de la columna control (-ECA-I) se descartaron.

La búsqueda en la base de datos BIOPEP y la revisión de publicaciones científicas indicó que estas secuencias no han sido reportadas por otros autores como péptidos IECA-I. Para confirmar si corresponden a péptidos IECA-I se seleccionaron las secuencias con mayor valor de score y la secuencia C-terminal considerando los datos de relación estructura/función de los péptidos IECA-I.

Todas las secuencias identificadas, pertenecen a la misma región de la secuencia de ALA (FIGURA 40). Las secuencias: TTFHTSGY y GYDTQAIQV se seleccionaron debido a que fueron identificadas en las dos modalidades de búsqueda con altos valores de score. Además, ambos péptidos presentaron residuos hidrofóbicos en el extremo C-terminal una característica frecuente y favorable en los péptidos IECA-I (Sagardia et al., 2013).

TABLA 24. Secuencias identificadas en la búsqueda en la base de datos local contra la secuencia de ALA (UniProtKB - P00711) y en las base de datos públicas para masas detectadas en la muestra eluida de la columna de afinidad (+ ECA-I) y que no se encontraron en la columna control (- ECA-I).

Mr(esp)	Mr(calc)	Delta	Score	Fragmento	Peptide	Base de datos
811.2100	811.3501	-0.1400	41	49-55	T.TFHTSGY.D	L
825.0261	825.3293	-0.3033	37	50-56	T.FHTSGYD.T	L
912.4132	912.3978	0.0154	57	48-55	C.TTFHTSGY.D	L/P
926.7511	926.3770	0.3741	43	49-56	T.TFHTSGYD.T	L
992.7431	993.4767	-0.7337	39	54-62	S.GYDTQAIQV.Q	L
992.7431	993.4767	-0.7337	53	54-62	S.GYDTQAIQV.Q	P
1027.1617	1027.4247	-0.2630	37	48-56	C.TTFHTSGYD.T	L
1372.4372	1371.6935	0.7436	45	116-127	L.DKVGIGNYWLAH.K	L
1080.83	1080.50	0.3224	58	53-62	T.SGYDTQAIQV.N	P
1319.17	1318.61	0.5625	53	51-62	F.HTSGYDTQAIQV.N	P
1668.16	1667.77	0.3896	58	48-62	C.TTFHTSGYDTQAIQV.N	P

L= base de datos local; P= bases de datos publicas

La secuencia DKVGIGNYWLAH, identificada en la base de datos local, presenta una secuencia que difiere en un residuo (presenta una glicina adicional) a la correspondiente al fragmento DKVGINYWLAH de ALA. Por este motivo no corresponde a la secuencia de ALA y no puede considerarse un producto de su hidrólisis. De todas formas, debido a que coincide parcialmente con secuencias de péptidos IECA-I previamente identificadas se realizó su caracterización. Los péptidos DKVGINY y DKVGINYW se identificaron como péptidos IECA-I en hidrolizados de LS con peptidasas de *Cynara cardunculus* (Tavares et al., 2011). Las secuencias WALHK y VGINYWLAHK también se identificaron como péptidos IECA-I en un hidrolizado de ALA con tripsina (Pihlanto-Leppälä et al., 2000).

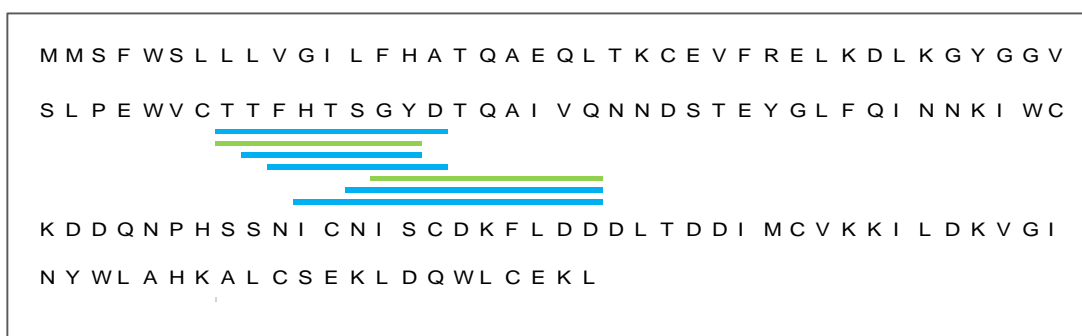


Figura 40. Secuencia de ALA bovina (UniProtKB - P00711) en la que se ubican las secuencias de los péptidos identificados a partir del FHALA del HALA con peptidasas de *Bromelia antiacantha*. En verde se indican los péptidos que fueron seleccionados para sintetizarlos químicamente y caracterizarlos.

4.4.5 Actividad IECA-I de los péptidos sintetizados

Los péptidos TTFHTSGY, GYDTQAIQVQ y DKVGIGNYWLAH se sintetizaron químicamente (98,97; 98,03 y 98,51 % de pureza respectivamente, ver Anexo 3) y su actividad IECA-I fue ensayada. Los tres péptidos mostraron actividad IECA-I y una relación dosis respuesta (FIGURA 41 A-C) con valores de IC_{50} (TABLA 25) que indican una importante potencia. Los péptidos IECA-I derivados de ALA depositados en BIOPEP (Anexo4) presentan valores de IC_{50} que mayoritariamente son del orden micromolar.

DKVGIGNYWLAH fue el péptido más potente de los tres péptidos IECA-I estudiados. Los péptidos WALHK ($IC_{50}=77 \mu\text{M}$) y VGINYWLAHK ($IC_{50}=327 \mu\text{M}$) (Pihlanto-Leppälä et al., 2000) y DKVGINY ($IC_{50}=99 \mu\text{M}$) (Tavares, et al., 2011) fueron menos potentes que DKVGIGNYWLAH. Mientras el péptido DKVGINYW ($IC_{50}=25,4 \mu\text{M}$), identificado en un hidrolizados de concentrado de LS con el extracto crudo de flor de cardo (*Cynara cardunculus*) presentó un valor de IC_{50} comparable al del péptido DKVGIGNYWLAH (Tavares et al., 2011).

TTFHTSGY y GYDTQAIQVQ presentaron valores de IC_{50} más altos que DKVGIGNYWLAH, especialmente GYDTQAIQVQ que presentó un IC_{50} del orden milimolar. Sin embargo, como resultado de una simulación de digestión gastrointestinal de GYDTQAIQVQ se obtuvieron tres fragmentos de los cuales dos se reportaron como péptidos inhibidores de ECA-I (Apéndice 3). Estos fragmentos son el dipéptido GY (BIOPEP ID: 3532) y el tripéptido IVQ (BIOPEP ID: 9045) con valores de IC_{50} de 210 y 95,5 μM respectivamente. Además, IVQ es un péptido multifuncional ya que también se confirmó que presenta actividad inhibitoria de la dipeptidil peptidasa IV (BIOPEP ID: 8788). De acuerdo a esto, GYDTQAIQVQ podría comportarse como un inhibidor del tipo *prodroga*, es decir que es convertido en inhibidor luego de la digestión gastrointestinal o como en este caso que luego de la digestión se convertiría en dos péptidos inhibidores más potentes que el péptido original (Li, Le, Shi, & Shrestha, 2004).

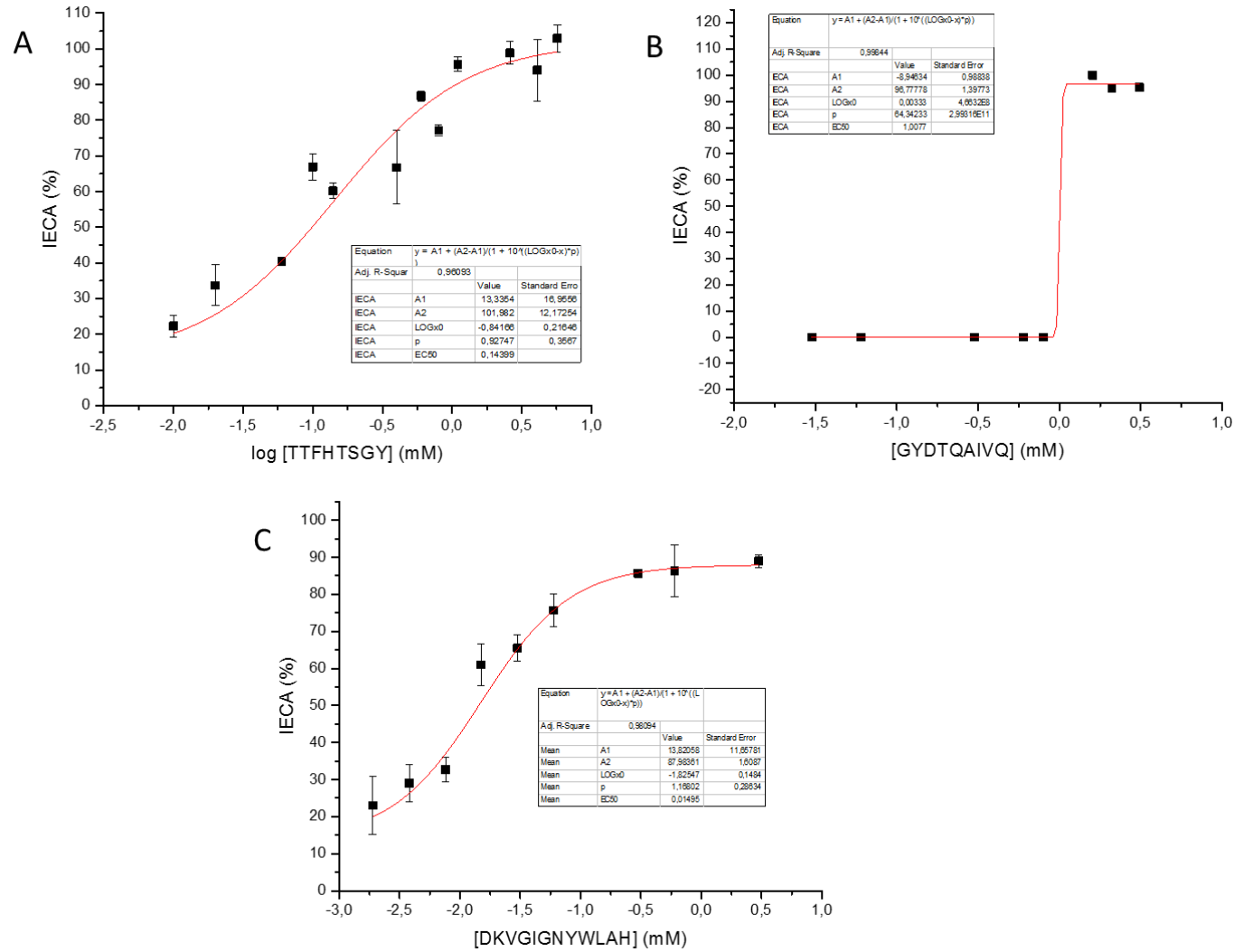


FIGURA 41. Relación dosis respuesta de los péptidos sintéticos derivados de ALA: (A) péptido TTFHTSGY y (B) péptido GYDTQAI VQ, y (C) del péptido sintético DKVGIGNY WLAH.

TABLA 25. IC ₅₀ de péptidos IECA-I sintéticos derivados del hidrolizado de ALA y del péptido sintético DKVGIGNYWLAH.		
Secuencia	Masa molecular (Da)	IC ₅₀ (μM)
TTFHTSGY	912,96	142
GYDTQAIVQ	994,08	1.000
DKVGIGNYWLAH	1372,56	15

4.4.6 Perfil de RP-HPLC de los péptidos sintéticos

Los perfiles de RP-HPLC de los péptidos sintéticos con actividad IECA-I se compararon con el del hidrolizado de ALA a partir del cual fueron identificados. Los cromatogramas se muestran en la FIGURA 42. Como se puede observar al comparar las FIGURAS 42B Y C CON LA FIGURA 42A los picos de los péptidos sintéticos coinciden con picos del hidrolizado de ALA.

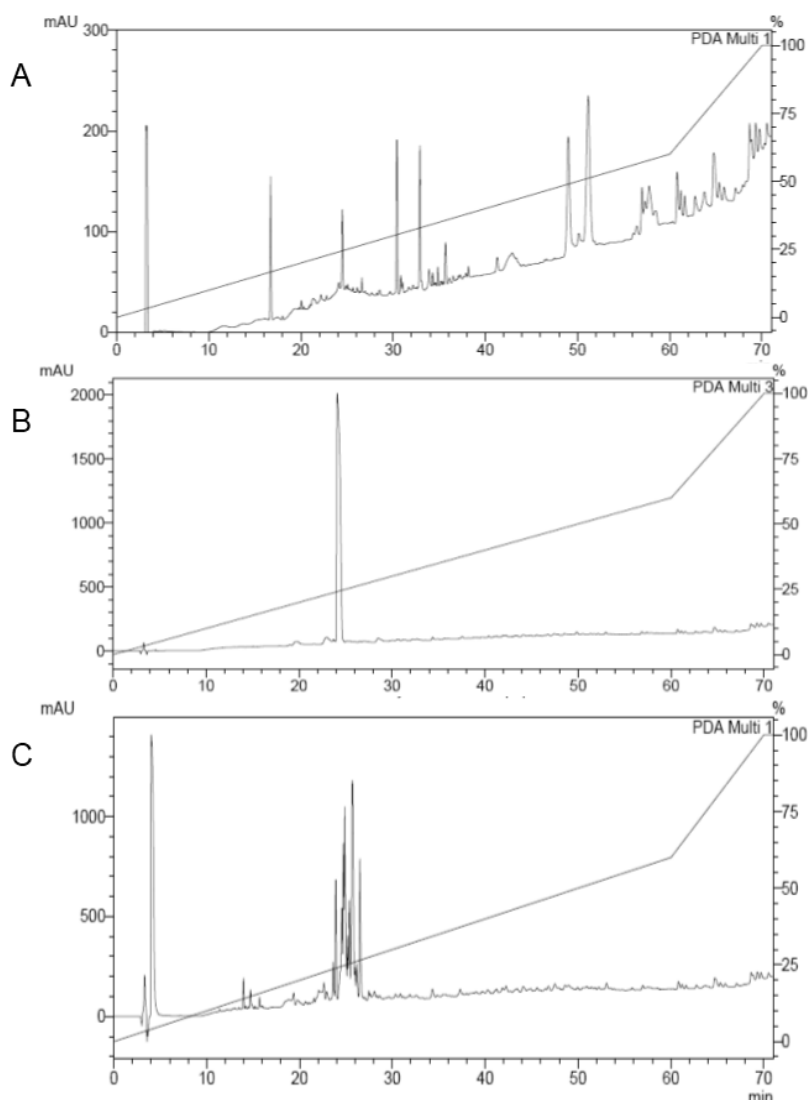


FIGURA 42. Perfiles de RP-HPLC de (A) hidrolizado de ALA; (B) péptido sintético TTFHTSGY y (C) péptido sintético GYDTQAIVQ.

4.4.7 Caracterización estructural de los péptidos IECA-I identificados

En la FIGURA 43 se muestra la ubicación de los péptidos IECA-I identificados en la estructura tridimensional de ALA. Como se puede apreciar, ambas secuencias se encuentran accesibles al ataque proteolítico. La secuencia TTFHTSGY forma parte de la hélice α H2 y el giro que la conecta con la hebra β S1, mientras que GYDTQAIVQ que se solapa con los dos últimos residuos de TTFHTSGY comprende el resto de este giro y la hebra β S1.

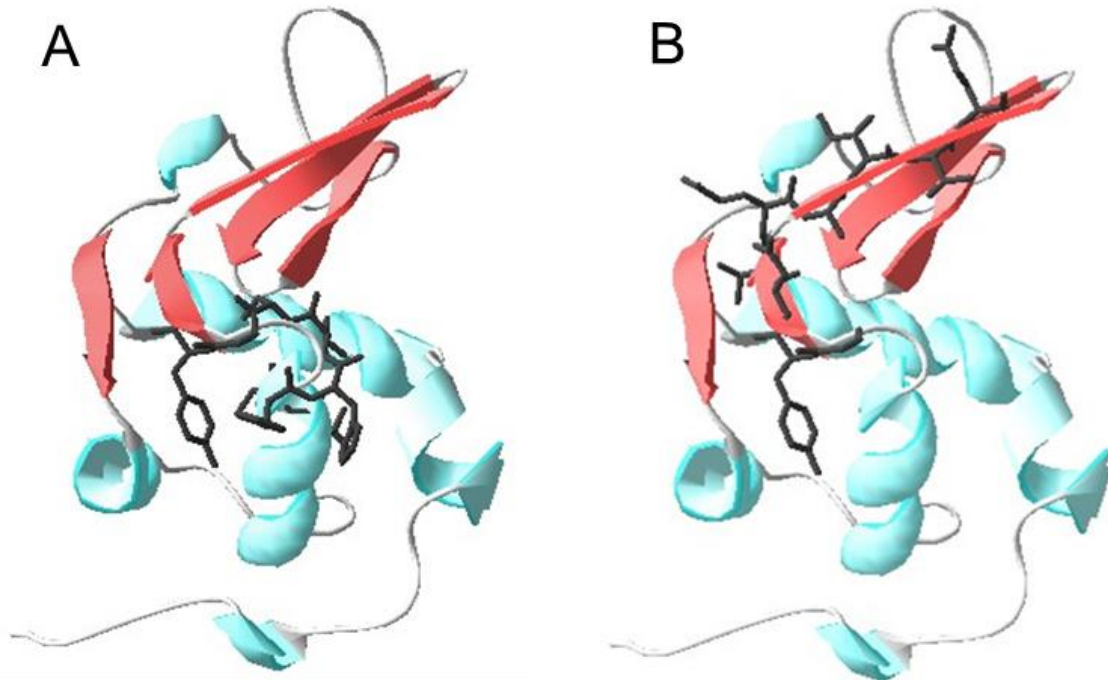


FIGURA 43. Ubicación en la estructura de ALA bovinade los péptidos: (A) TTFHTSGY [f48-55] y (B) GYDTQAIVQ [f54-62]. Estos péptidos fueron purificados por cromatografía de afinidad a partir de un hidrolizado de ALA preparado con peptidasas de *Bromelia antiacantha*. Imágenes generadas con el software Swiss-Pdb Viewer v4.1 (Guex & Peitsch, 1997) utilizando la estructura cristalina de ALA bovina (PDB ID: 1f6s).

Los tres péptidos identificados presentan una masa molecular cercana a 1000 Da (TABLA 26) coincidiendo con el tamaño molecular de los péptidos IECA-I reportados por otros autores. Los puntos isoeléctricos y el porcentaje de hidrofobicidad se muestran en la TABLA 26.

TABLA 26. Secuencias de péptidos IECA-I purificados e identificados a partir de hidrolizado de ALA.			
Secuencia	Masa molecular (Da)	Punto Isoeléctrico	Hidrofobicidad (%)
TTFHTSGY	912,96	6,4	12,5
GYDTQAIVQ	994,08	3,8	33,33
DKVGIGNYWLAH	1372,56	6,7	41,67

4.4.8 Caracterización cinética de los péptidos IECA-I identificados

La cinética de inhibición de ECA-I se estudió monitoreando espectrofotométricamente ($\lambda = 340$ nm) la hidrólisis del sustrato N-[3-(2-furyl) acroyloyl]-L-fenilalanilglicilglicina (FAPGG) a 37 °C.

Se determinó la velocidad inicial (v_0) de la reacción de hidrólisis de FAPGG en ausencia de inhibidor y paralelamente con concentraciones crecientes de cada uno de los inhibidores dejando fijas las concentraciones de ECA-I (14 o 28 nM) y FAPGG (0,6 o 0,9 mM). A partir de los gráficos de v_0 en función de concentración de inhibidor fue posible establecer que TTFHTSGY (FIGURA 44A) y DKVGIGNYWLAH (FIGURA 44B) se comportaron como inhibidores totales. El péptido GYDTQAIQV (FIGURA 44C), en concentraciones elevadas, fue capaz de inhibir solo parcialmente a la ECA-I, resultando un inhibidor poco efectivo por lo que no se continuó con su caracterización.

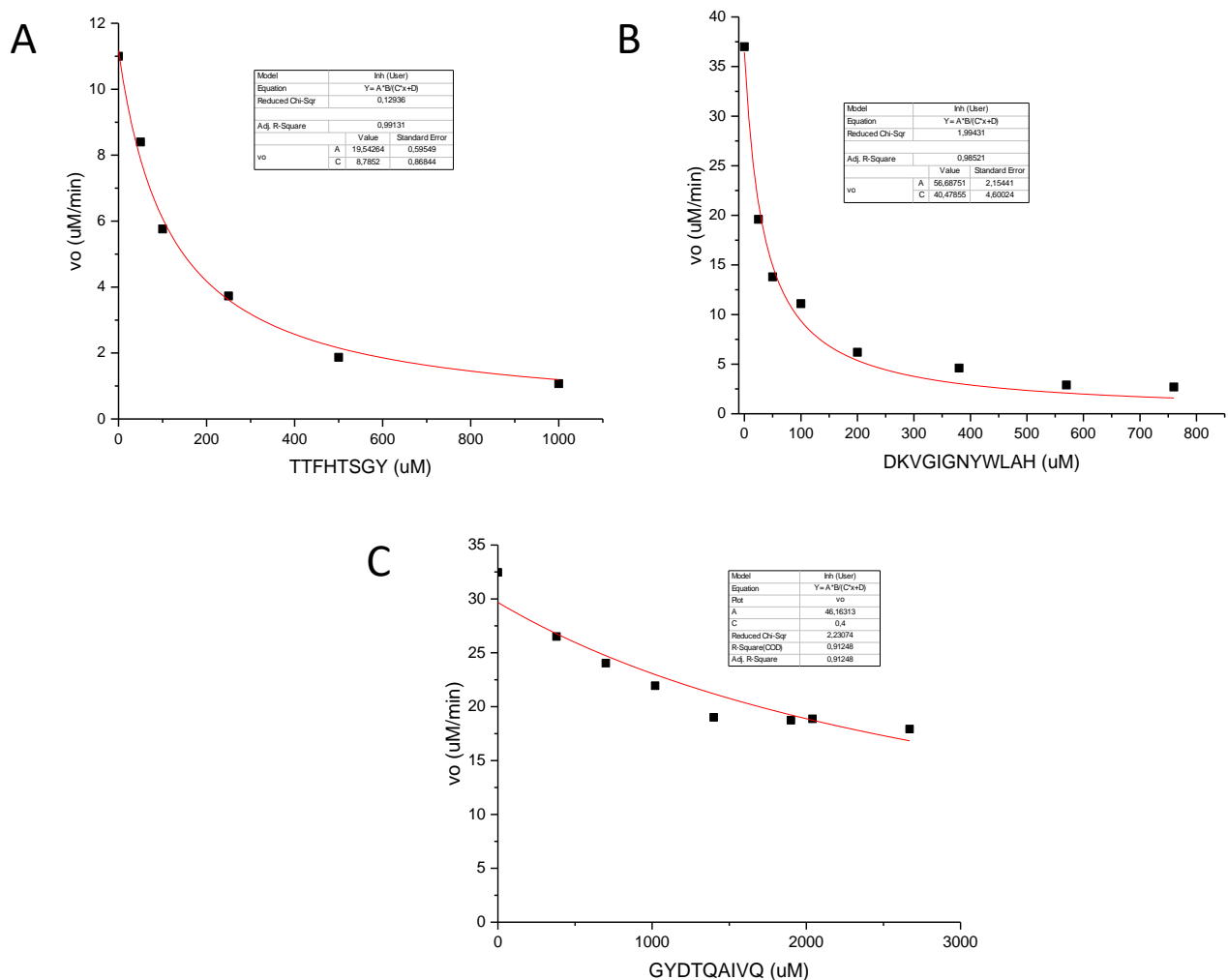


FIGURA 44. Estudios de inhibición de ECA-I. Inhibición de ECA-I con diferentes concentraciones de inhibidor: (A) TTFHTSGY (0 a 1 mM); (B) DKVGIGNYWLAH (0-0,45 mM) y GYDTQAIQV (0 a 2,8 mM) a concentración de sustrato y ECA-I constantes.

Para estudiar el tipo de inhibición que presentan los péptidos TTFHTSGY y DKVGIGNYWLAH se determinaron los parámetros cinéticos de ECA-I en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de los inhibidores. Para esto, en cada caso, se midió la v_o de la reacción utilizando concentraciones variables de sustrato (FAPGG: 0,1-1,5 mM) y manteniendo fija la concentración de ECA-I. Se realizaron gráficos de $[S]/v_o$ versus $[S]$ para cada concentración de inhibidor que se muestran en las FIGURAS 45 y 46. Los valores de K_{Map} y $V_{Max.ap}$ fueron determinados a partir del ajuste de los datos a la ecuación:

$$\frac{[S]}{v_o} = \frac{1}{V_{Max}} [S] + \frac{K_M}{V_{Max}} \quad [Ecuación 7]$$

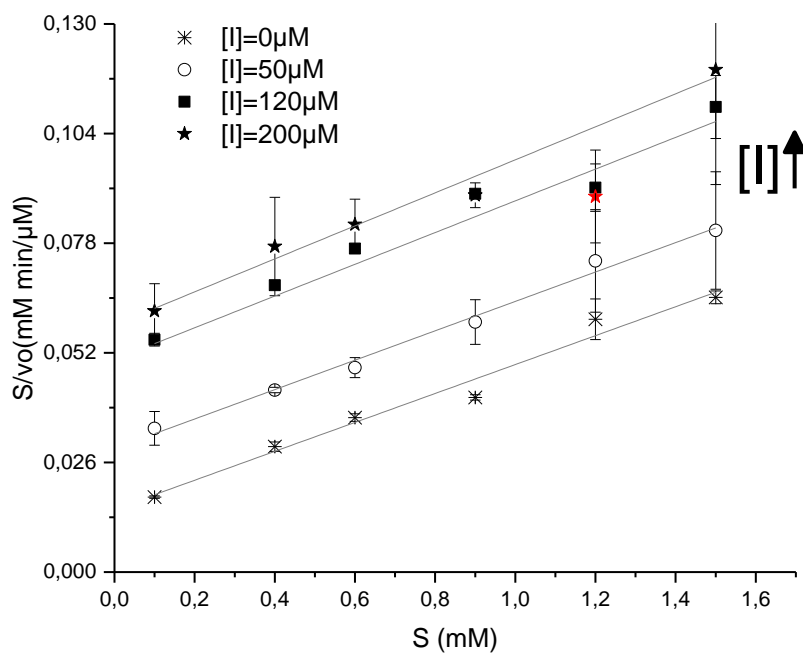


FIGURA 45. Estudio cinético del tipo de inhibición de ECA-I por el péptido TTFHTSGY. Se muestran los gráficos de Hanes Woolf, $[S]/v_o$ de ECA-I para la hidrólisis de FAPGG versus $[S]$, en ausencia de inhibidor y presencia de diferentes concentraciones de TTFHTSGY. La concentración de ECA-I inicial se mantuvo constante en 14 nM.

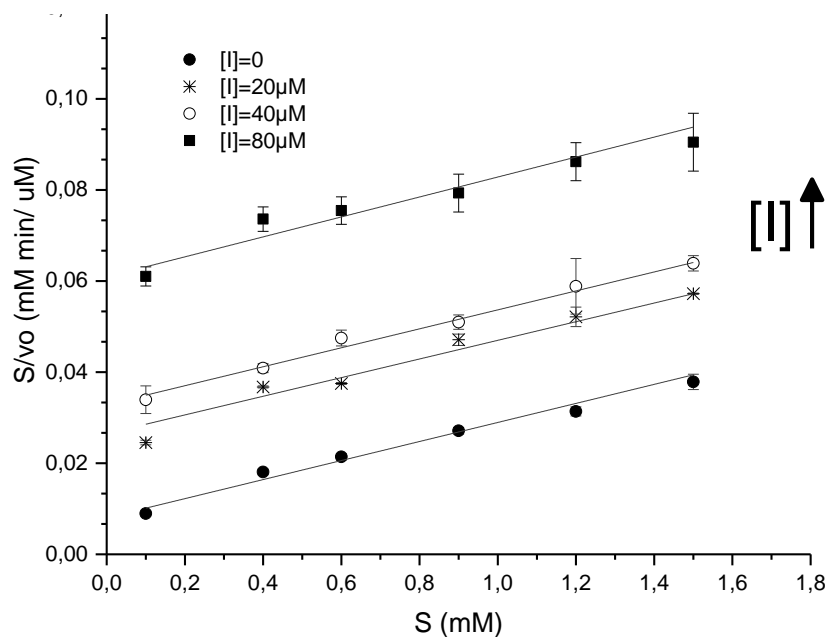


FIGURA 46. Estudio cinético del tipo de inhibición de ECA-I por el péptido DKVGIGNYWLAH. Se muestran los gráficos de Hanes Woolf, $[S]/(v_0 \text{ de ECA-I para la hidrólisis de FAPGG})$ versus $[FAPGG]$, en ausencia de inhibidor y presencia de diferentes concentraciones de DKVGIGNYWLAH. La concentración de ECA-I inicial se mantuvo constante en 28 nM.

Los gráficos de Hanes Woolf para ambos péptidos (FIGURAS 45 Y 46) presentaron un patrón de líneas paralelas, característico de una inhibición competitiva. En las TABLAS 27 y 28 respectivamente se muestran los valores que presentaron las $K_{M \text{ ap}}$ y $V_{Max \text{ ap}}$, cuando la v_0 de ECA-I para la hidrólisis de FAPGG, se midió en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor. En ambos casos se observó un claro incremento en el valor de la $K_{M \text{ ap}}$ con el aumento de la concentración de inhibidor mientras que la $V_{Max \text{ ap}}$ permaneció incambiada indicando que TFHTSGY y DKVGIGNYWLAH se comportaron como inhibidores competitivos. La mayoría de los péptidos IECA-I reportados presentaron un tipo de inhibición competitiva, como en el caso de los resultados obtenidos en este trabajo (Li et al., 2004), aunque también se han reportado péptidos IECA-I cuyo mecanismo de inhibición fue no-competitivo o acompetitivo.

TABLA 27. Parámetros cinéticos de ECA-I para la hidrólisis de FAPGG en presencia de diferentes concentraciones de TTFHTSGY calculados a partir del ajuste de los datos a la ecuación de Hanes Woolf.

$[TTFHTSGY]$ (uM)	$V_{Max.ap.}$ (uM/min)	$K_{Map.}$ (mM)
0	$29 \pm 2,7$	$0,43 \pm 0,12$
50	$29 \pm 1,4$	$0,83 \pm 0,09$
120	$27 \pm 3,9$	$1,34 \pm 0,36$
200	$26 \pm 8,9$	$1,49 \pm 0,83$

TABLA 28. Parámetros cinéticos de ECA-I para la hidrólisis de FAPGG en presencia de diferentes concentraciones de DKVGIGNYWLAH calculados a partir del ajuste de los datos a la ecuación de Hanes Woolf.

[DKVGIGNYWLAH] (uM)	$V_{Max.ap.}$ (uM/min)	$K_{Map.}$ (mM)
0	48 ± 3,6	0,43 ± 0,12
20	49 ± 4,2	1,30 ± 0,20
40	48 ± 7,0	1,58 ± 0,41
80	46 ± 8,3	2,80 ± 0,73

Las K_i se calcularon por dos métodos independientes.

A partir de los gráficos de v_0 en función de $[I]$ se realizó un ajuste a la ecuación de velocidad para inhibidores competitivos (ecuación 8):

$$v_0 = \frac{V_{Max}[S]}{\frac{K_M}{K_i}[I] + K_M + [S]} \quad [Ecuación 8]$$

Utilizando el valor de K_M determinado independientemente, se despejó el valor de K_i para cada inhibidor (Apéndice 4).

Por otra parte, se calcularon los valores de K_i a partir de gráficos de $[S]/v_0$ vs $[I]$ (gráficos de Cornish Bowden, FIGURAS 47 Y 48). Los valores de K_i se obtuvieron del ajuste lineal a la ecuación 9 (Apéndice 5):

$$\frac{[S]}{v_0} = \frac{K_M}{K_i V_{Max}} [I] + \frac{K_M + [S]}{V_{Max}} \quad [Ecuación 9]$$

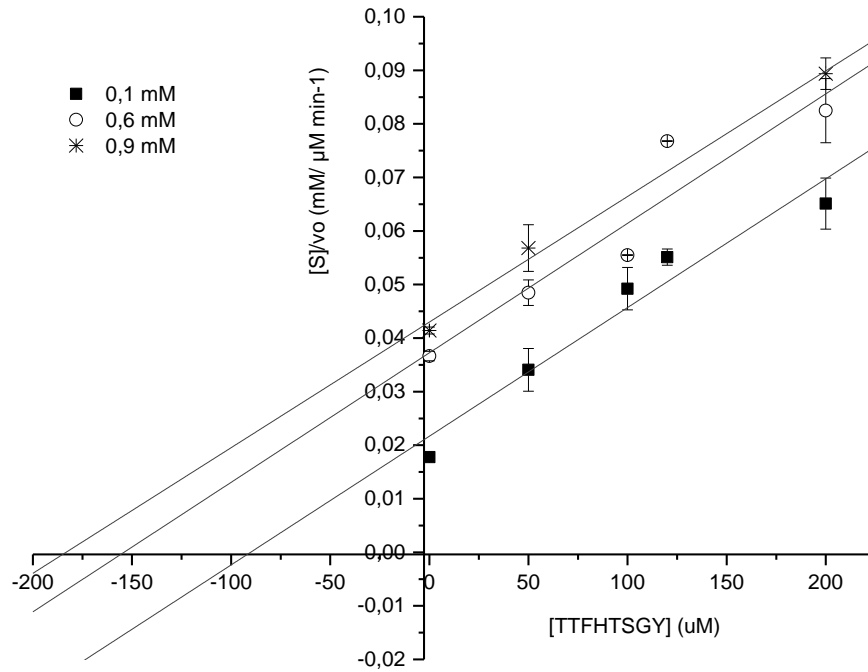


FIGURA 47. Gráfico de Cornish Bowden para la determinación de la constante de inhibición de ECA-I por parte del péptido TTFHTSGY.

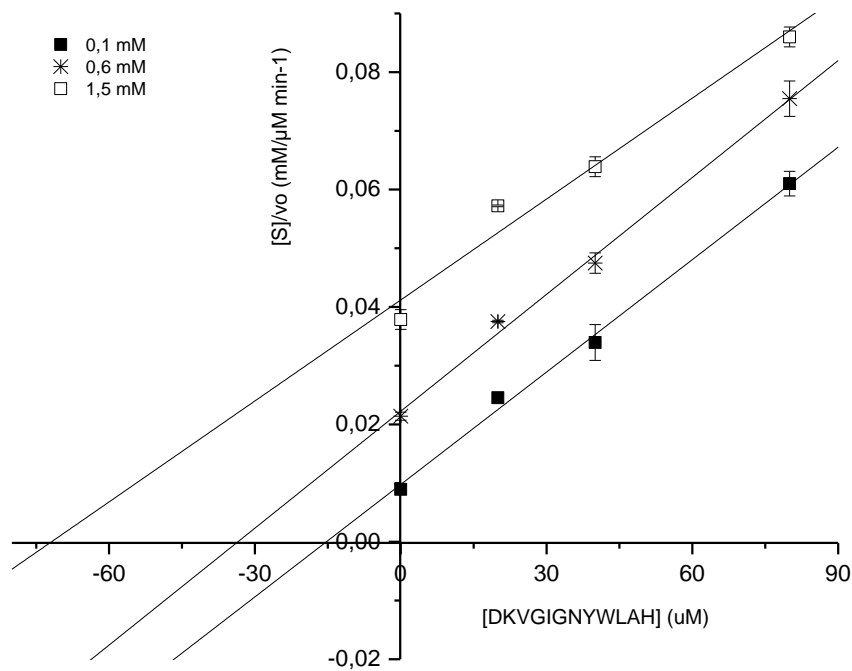


FIGURA 48. Gráfico de Cornish Bowden para la determinación de la constante de inhibición de ECA-I por parte del péptido DKVGIGNYWLAH.

Se obtuvieron resultados comparables que se muestran en la TABLA 29.

TABLA 29. K_i de los péptidos IECA-I, DKVGIGNYWLAH y TTFHTSGY			
Péptido IECA-I	K_i (μM) ^a	K_i (μM) ^b	$[ECA I]_{ensayo}$ (nM)
TTFHTSGY	51	69 ± 5,3	28
DKVGIGNYWLAH	11	14 ± 5,6	14
^a Valor obtenido a partir de la ecuación 8.			
^b Valor obtenido a partir de gráficos secundarios de Cornish Bowden (ecuación 9)			

De acuerdo a los valores de K_i obtenidos, se trata de inhibidores reversibles competitivos clásicos, ya que la concentración de inhibidor requerida para causar inhibición es mucho mayor que la cantidad total de enzima. Si bien, estos inhibidores no son inhibidores de alta afinidad que tendrían relevancia como fármacos antihipertensivos es importante la evaluación de la actividad IECA-I *in vivo* debido a que se no siempre la actividad *in vitro* se relaciona con la actividad *in vivo*. Se han reportado casos en los que la actividad *in vitro* es muy potente y sin embargo su efecto *in vivo* es nulo o muy poco potente. También se conocen péptidos con baja actividad *in vitro* pero que demuestran una actividad muy potente *in vivo* (Iwaniak et al., 2014).

CONCLUSIONES

Las peptidasas de *B. antiacantha* fueron capaces de hidrolizar a las proteínas del LS y se establecieron las condiciones de reacción para lograr la degradación simultánea de ALA y BLG con grados de hidrólisis superiores al 10 %. La temperatura favoreció la hidrólisis del LS lográndose una mayor hidrólisis a 50 °C, temperatura a partir de la cual se favorece el desplegamiento de ALA y BLG. El pH de reacción fue el parámetro que determinó la selectividad de las peptidasas para la hidrólisis de ALA y BLG. Más allá del efecto del pH en la actividad de las peptidasas se observó una relación entre el pH de la reacción y las condiciones de desnaturalización de ALA y BLG que favorecieron su degradación y afectaron el mecanismo de hidrólisis.

Los parámetros cinéticos de PepBA para la hidrólisis de ALA y BLG fueron determinados a 50°C a tres valores de pH diferentes (pH 4,5; 7,0 y 9,2) y comparados con los correspondientes a papaína. PepBA mostró una mayor eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) para la hidrólisis de ALA a pH 4,5 dada por el bajo valor de K_M y a pH 9,2 debido a un mayor valor de k_{cat} . Para la hidrólisis de BLG PepBA presentó una mayor eficiencia a pH 9,2 debido al alto valor de k_{cat} . Dentro de las condiciones ensayadas, pH 9,2 fue la condición donde la eficiencia catalítica de PepBA fue mayor tanto para la hidrólisis de ALA como BLG. La eficiencia catalítica de papaína para la hidrólisis de ALA y BLG fue menor en comparación a la registrada para PepBA y no se observaron cambios significativos de los parámetros cinéticos con el pH.

En las condiciones seleccionadas, la hidrólisis de las proteínas mayoritarias del LS generó péptidos con actividad inhibitoria de ECA-I. A partir de los hidrolizados fraccionados por ultrafiltración se generaron fracciones de masa molecular inferior a 2 kDa (filtrados) enriquecidas en los componentes con actividad inhibitoria de ECA-I. EL filtrado del hidrolizado de ALA aislada presentó la actividad inhibitoria de la ECA-I más potente ($IC_{50} = 2,0 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$), seguido del correspondiente al hidrolizado de BLG ($IC_{50} = 12,0 \pm 2,0 \mu\text{g/mL}$) aislada y de LS ($IC_{50} = 36,0 \pm 2,0 \mu\text{g/mL}$).

La actividad inhibitoria de ECA-I de los filtrados de hidrolizados de LS, ALA y BLG fue resistente a la digestión gastrointestinal, evaluada en ensayos *in vitro*. Esta capacidad es muy importante para el uso de las fracciones peptídicas como componentes de alimentos funcionales.

Para la identificación de los péptidos responsables de la actividad IECA-I fue necesaria su purificación. Se probaron diferentes estrategias de purificación empleando las metodologías usuales para la purificación de péptidos como SEC y RP-HPLC. Debido a la complejidad de los hidrolizados y la baja concentración de los componentes no fue posible lograr un grado de purificación suficiente para la identificación de los péptidos de interés con los equipos y condiciones utilizadas.

Utilizando cromatografía de afinidad, en un solo paso, se capturaron dos nuevos péptidos inhibidores de ECA-I presentes en un hidrolizado de ALA obtenido por hidrólisis enzimática con las peptidasas de *B. antiacantha*. Estos inhibidores fueron identificados por RP-HPLC MS/MS y su actividad inhibitoria de ECA-I fue confirmada utilizando péptidos sintéticos. Los péptidos identificados presentaron las secuencias: TTFHTSGY (MW= 912,41 Da) y GYDTQAIQV (MW= 992,74 Da).

El péptido TTFHTSGY se comportó como un inhibidor total mientras que GYDTQAIQV fue capaz de inhibir parcialmente a ECA-I y a concentraciones elevadas de inhibidor por lo que no se continuó su caracterización. Sin embargo, GYDTQAIQV podría tener una importante actividad inhibitoria de ECA-I *in vivo* ya que formando parte de su secuencia se encuentran: el dipéptido GY (BIOPEP ID: 3532, inhibidor de ECA-I; ID: 8788, inhibidor de dipeptidil peptidasa IV) y el tripéptido IVQ (BIOPEP ID: 9045, inhibidor de ECA-I) que pueden ser liberados durante la degradación gastrointestinal. TTFHTSGY se comportó como un inhibidor competitivo con valor de K_i de $69 \pm 5,3 \mu\text{M}$, indicando que se trataba de un inhibidor reversible competitivo clásico como la mayoría de los inhibidores peptídicos de ECA-I.

Para conocer el alcance de la aplicación e importancia de estos péptidos como ingredientes de alimentos funcionales antihipertensivos es esencial realizar la caracterización de la actividad inhibitoria de ECA-I *in vivo*, en modelos animales. Si estos estudios demostraran la efectividad de estos péptidos *in vivo*, se realizaría un estudio de modelado de la interacción de los inhibidores con el sitio activo de la ECA-I. También, pensando en la posibilidad del uso de estos péptidos como ingredientes de un alimento funcional sería necesario realizar una evaluación de sus propiedades sensoriales.

Los resultados de este trabajo de tesis aportaron información relevante sobre la aplicación de peptidasas de una planta nativa para la producción de hidrolizados de proteínas de LS con propiedades bioactivas. Los resultados del estudio de la reacción de hidrólisis de las proteínas de LS resaltaron la importancia que tiene en el caso de las peptidasas, la evaluación de las condiciones de reacción con el sustrato que se quiere hidrolizar.

La cromatografía de afinidad desarrollada para este trabajo fue un método efectivo para la captura de los péptidos inhibidores de ECA-I. Se continuará evaluando las mejores condiciones para la unión y elución de los péptidos inhibidores de IECA-I, la posibilidad de usos repetidos y estabilidad de la enzima inmovilizada. Se evaluará esta estrategia de purificación para la identificación de los péptidos responsables de la actividad IECA-I de los hidrolizados de BLAG y LS.

REFERENCIAS

- Abubakar, a, Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., & Itoh, T. (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal of Dairy Science*, *81*(12), 3131–3138. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75878-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75878-3)
- Adje, E. Y., Balti, R., Lecouturier, D., Kouach, M., Dhulster, P., Guillochon, D., & Nedjar-Arroume, N. (2013). Controlled Enzymatic Hydrolysis: A New Strategy for the Discovery of Antimicrobial Peptides. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *5*(3), 176–186. <https://doi.org/10.1007/s12602-013-9138-y>
- Ahmad, B., Shamim, T. A., Haq, S. K., & Khan, R. H. (2007). Identification and characterization of functional intermediates of stem bromelain during urea and guanidine hydrochloride unfolding. *Journal of Biochemistry*, *141*(2), 251–259. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm026>
- Akif, M., Schwager, S. L., Anthony, C. S., Czarny, B., Beau, F., Dive, V., ... Acharya, K. R. (2011). Novel mechanism of inhibition of human angiotensin-I-converting enzyme (ACE) by a highly specific phosphinic tripeptide. *The Biochemical Journal*, *436*(1), 53–59. <https://doi.org/10.1042/BJ20102123>
- Andrews, B. A., & Asenjo, J. A. (1986). Synthesis and regulation of extracellular beta (1-3) glucanase and protease by cytophaga sp. In batch and continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*, *28*(9), 1366–1375. <https://doi.org/10.1002/bit.260280911>
- Anthony, C. S., Corradi, H. R., Schwager, S. L. U., Redelinghuys, P., Georgiadis, D., Dive, V., ... Sturrock, E. D. (2010). The N Domain of Human Angiotensin-I-converting Enzyme: the Role of N-Glycosylation and the Crystal Structure in Complex with an N Domain-Specific Phosphinic Inhibitor, RXP407. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(46), 35685–35693. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.167866>
- Bansal, N., & Bhandari, B. (2016). Functional milk proteins: Production and utilization-whey-based ingredients. In *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects: Fourth Edition* (pp. 67–98). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_3
- Barros, R. M., & Malcata, F. X. (2002). Modeling the kinetics of whey protein hydrolysis brought about by enzymes from *Cynara cardunculus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(15), 4347–4356. <https://doi.org/10.1021/jf0200319>
- Barros, R. M., & Xavier Malcata, F. (2004). A kinetic model for hydrolysis of whey proteins by cardosin A extracted from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*, *88*(3), 351–359. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.046>
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína : procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, *42*(2), 227–237. <https://doi.org/10.1851/1851-6114>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., ... Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 235–42.
- Bertucci, J. I., Liggieri, C. S., Colombo, M. L., Vairo Cavalli, S. E., & Bruno, M. A. (2015). Application of peptidases from *Maclura pomifera* fruit for the production of active biopeptides from

- whey protein. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.041>
- Boelsma, E., & Kloek, J. (2009). Lactotripeptides and antihypertensive effects: a critical review. *British Journal of Nutrition*, 101(06), 776. <https://doi.org/10.1017/S0007114508137722>
- Boutrou, R., Gaudichon, C., Dupont, D., Jardin, J., Airinei, G., Marsset-Baglieri, A., ... Leonil, J. (2013). Sequential release of milk protein-derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 97(6), 1314–1323. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.055202>
- Boye, J. I., Alli, I., & Ismail, A. A. (1997). Use of Differential Scanning Calorimetry and Infrared Spectroscopy in the Study of Thermal and Structural Stability of α -Lactalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1116–1125. <https://doi.org/10.1021/jf960360z>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bruno, M. A., Lazza, C. M., Errasti, M. E., López, L. M. I., Caffini, N. O., & Pardo, M. F. (2010). Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 695–701. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.003>
- Butré, C. I., Sforza, S., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2015). Determination of the influence of the pH of hydrolysis on enzyme selectivity of *Bacillus licheniformis* protease towards whey protein isolate. *International Dairy Journal*, 44, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.12.007>
- Buttery, J. E., & Stuart, S. (1993). Assessment and optimization of kinetic methods for angiotensin-converting enzyme in plasma. *Clinical Chemistry*, 39(2).
- Byers, L., & Wolfenden, R. (1972). A potent reversible inhibitor of carboxypeptidase A. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(2), 606–8.
- Chalabi, M., Khademi, F., Yarani, R., & Mostafaie, A. (2014). Proteolytic activities of kiwifruit actinidin (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) on different fibrous and globular proteins: A comparative study of actinidin with papain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(8), 4025–4037. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0812-7>
- Cheison, S. C., Bor, E. K., Faraj, A. K., & Kulozik, U. (2012). Selective hydrolysis of β -lactalbumin by Acid Protease A offers potential for β -lactoglobulin purification in whey proteins. *LWT - Food Science and Technology*, 49(1), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.022>
- Cheison, S. C., Leeb, E., Toro-Sierra, J., & Kulozik, U. (2011). Influence of hydrolysis temperature and pH on the selective hydrolysis of whey proteins by trypsin and potential recovery of native α -lactalbumin. *International Dairy Journal*, 21(3), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.09.008>
- Chrysina, E. D., Brew, K., & Acharya, K. R. (2000). Crystal structures of apo- and holo-bovine α -lactalbumin at 2.2-Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions. *The*

- Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 37021–9.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M004752200>
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., & Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *Journal of Dairy Science*, 66(6), 1219–1227. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81926-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2)
- Cimino, C. V., Colombo, M. L., Liggieri, C. S., Bruno, M. A., & Vairo-Cavalli, S. E. (2015). Partial Molecular Characterization of Arctium minus Aspartylendopeptidase and Preparation of Bioactive Peptides by Whey Protein Hydrolysis. *Journal of Medicinal Food*, 18(8), 856–64. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.0101>
- Cushman, D. W., & Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin I-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20, 1637–1648. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(71\)90292-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(71)90292-9)
- Cushman, D. W., & Ondetti, M. A. (1999). Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nature Medicine*, 5(10), 1110–1113. <https://doi.org/10.1038/13423>
- deWit, J. N., & Klarenbeek, G. (1984). Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 67(11), 2701–2710. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81628-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81628-8)
- Doyon, M., & Labrecque, J. (2008). Functional foods: a conceptual definition. *British Food Journal*, 110(11), 1133–1149. <https://doi.org/10.1108/00070700810918036>
- Dziuba, M., & Darewicz, M. (2007). Food Proteins as Precursors of Bioactive Peptides — Classification Into Families. *Food Science and Technology International*, 13(6), 393–404. <https://doi.org/10.1177/1082013208085933>
- Edwards, P. B., Creamer, L. K., & Jameson, G. B. (2008). Chapter 6 – Structure and stability of whey proteins. In *Milk Proteins*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.00006-4>
- Egger, L., & Ménard, O. (2017, April 1). Update on bioactive peptides after milk and cheese digestion. *Current Opinion in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.03.003>
- Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., ... Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk--sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641–1674. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6)
- FitzGerald, R. J., & Meisel, H. (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *The British Journal of Nutrition*, 84 Suppl 1, S33-7.
- Fitzgerald, R. J., & Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59(2), 118–125. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2006.00250.x>
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A., & Walsh, D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of Nutrition*, 134(4), 980S–8S.

- Flower, D. R., North, A. C. T., & Sansom, C. E. (2000). The lipocalin protein family: Structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00148-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00148-5)
- Foltz, M., Meynen, E. E., Bianco, V., van Platerink, C., Koning, T. M. M. G., & Kloek, J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotripeptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation. *The Journal of Nutrition*, *137*(4), 953–8.
- Fontana, A., De Laureto, P. P., Spolaore, B., Frare, E., Picotti, P., & Zambonin, M. (2004). Probing protein structure by limited proteolysis. In *Acta Biochimica Polonica* (Vol. 51, pp. 299–321). <https://doi.org/035001299>
- Geleijnse, J. M., & Engberink, M. F. (2010). Lactopeptides and human blood pressure. *Current Opinion in Lipidology*, *21*(1), 58–63. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283333813>
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., & Di Cagno, R. (2002). Latent Bioactive Peptides in Milk Proteins: Proteolytic Activation and Significance in Dairy Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *42*(3), 223–239. <https://doi.org/10.1080/10408690290825538>
- Gottschalk, M., Nilsson, H., Roos, H., & Halle, B. (2003). Protein self-association in solution: The bovine β -lactoglobulin dimer and octamer. *Protein Science*, *12*(11), 2404–2411. <https://doi.org/10.1110/ps.0305903>
- Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, *18*(15), 2714–2723. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181505>
- Haug, I. J., Skar, H. M., Vegarud, G. E., Langsrud, T., & Draget, K. I. (2009). Electrostatic effects on β -lactoglobulin transitions during heat denaturation as studied by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, *23*(8), 2287–2293. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.06.006>
- He, H.-L., Liu, D., & Ma, C.-B. (2013). Review on the Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitor Peptides from Marine Proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *169*(3), 738–749. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0024-y>
- Homaei, A. A., Sajedi, R. H., Sariri, R., Seyfzadeh, S., & Stevanato, R. (2010). Cysteine enhances activity and stability of immobilized papain. *Amino Acids*, *38*(3), 937–942. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0302-3>
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., & Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? *Peptides*. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.02.005>
- Ibrahim, M. M. (2006). RAS inhibition in hypertension. *Journal of Human Hypertension*, *20*(2), 101–108. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1001960>
- Ivanov, V. T., Karelin, A. A., Blischenko, E. Y., Philippova, M. M., & Nazimov, I. V. (1998). Proteolytic degradation of hemoglobin in vivo. Role in formation of tissue specific peptide pool. *Pure and Applied Chemistry*, *70*(1), 67–74. <https://doi.org/10.1351/pac199870010067>

- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., & Darewicz, M. (2014). Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 114–134. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12051>
- Juárez, M. (2010). Presente y futuro de los alimentos funcionales. In *Alimentos saludables y de diseño específico. Alimentos funcionales* (pp. 29–44). Madrid: Instituto Tomas Pascual Sanz.
- Kamath, V., Rajini, P., Lohith, K., Somashekar, B., & Divakar, S. (2006). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of amino acid esters of carbohydrates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38(2), 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.01.008>
- Karelín, A. A., Blishchenko, E. Y., & Ivanov, V. T. (1998, May 22). A novel system of peptidergic regulation. *FEBS Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00486-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00486-4)
- Kitts, D. D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1309–23.
- Kontopidis, G., Holt, C., & Sawyer, L. (2004). Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 785–796. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73222-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73222-1)
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006, September 1). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>
- Korhonen, H., & Pihlanto Leppala, A. (2003). Milk-Derived Bioactive Peptides. In C. Shortt & J. O'Brien (Eds.), *Handbook of Functional Dairy Products*. Florida: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203009734.ch6>
- Kuwajima, K. (1996). The molten globule state of alpha-lactalbumin. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(1), 102–9.
- Lan, X., Liao, D., Wu, S., Wang, F., Sun, J., & Tong, Z. (2015). Rapid purification and characterization of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from lizard fish protein hydrolysates with magnetic affinity separation. *Food Chemistry*, 182, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.004>
- Laskowski, R. A., Hutchinson, E. G., Michie, A. D., Wallace, A. C., Jones, M. L., & Thornton, J. M. (1997). PDBsum: A Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. *Trends in Biochemical Sciences*. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(97\)01140-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01140-7)
- Leckie, B. J. (2005). Targeting the renin-angiotensin system: what's new? *Current Medicinal Chemistry. Cardiovascular and Hematological Agents*, 3(1), 23–32. <https://doi.org/10.2174/1568016052773298>
- Li, G.-H., Le, G.-W., Shi, Y.-H., & Shrestha, S. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research*, 24(7), 469–486. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2003.10.014>

- Lieske, B., & Konrad, G. (1996). Interrelation between pH and availability of α -lactalbumin and β -lactoglobulin for proteolysis by papain. *International Dairy Journal*, 6(4), 359–370. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00028-3](https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)00028-3)
- Lisak, K., Toro-Sierra, J., Kulozik, U., Božanić, R., & Cheison, S. C. (2013). Chymotrypsin selectively digests β -lactoglobulin in whey protein isolate away from enzyme optimal conditions: potential for native α -lactalbumin purification. *The Journal of Dairy Research*, 80(1), 14–20. <https://doi.org/10.1017/S0022029912000416>
- Lo Piero, A. R., Puglisi, I., & Petrone, G. (2011). Characterization of the purified actinidin as a plant coagulant of bovine milk. *European Food Research and Technology*, 233(3), 517–524. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1543-4>
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. del M., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Millán, F., & Vioque, J. (2006). Immobilization of Angiotensin-Converting Enzyme on Glyoxyl-Agarose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4641–4645. <https://doi.org/10.1021/jf0606860>
- Meisel, H. (2004). Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *BioFactors*, 21(1–4), 55–61. <https://doi.org/10.1002/biof.552210111>
- Menard, J., & Patchett, A. A. (2001). Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Advances in Protein Chemistry*, 56, 13–75.
- Minkiewicz, P., Dziuba, J., Iwaniak, A., Dziuba, M., & Darewicz, M. (2008). BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. In *Journal of AOAC International* (Vol. 91, pp. 965–980).
- Mullally, M. M., Meisel, H., & Fitzgerald, R. J. (1997). Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Letters*, 402(2–3), 99–101. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01503-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01503-7)
- Mullally, M. M., Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (1996). Synthetic peptides corresponding to alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 377(4), 259–60.
- Murakami, M., Tonouchi, H., Takahashi, R., Kitazawa, H., Kawai, Y., Negishi, H., & Saito, T. (2004). Structural Analysis of a New Anti-Hypertensive Peptide (β -Lactosin B) Isolated from a Commercial Whey Product. *Journal of Dairy Science*, 87, 1967–1974. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70013-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70013-2)
- Murray, B., & FitzGerald, R. (2007). Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Food Proteins: Biochemistry, Bioactivity and Production. *Current Pharmaceutical Design*, 13(8), 773–791. <https://doi.org/10.2174/138161207780363068>
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., & Takano, T. (1995). Purification and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors from Sour Milk. *Journal of Dairy Science*, 78(4), 777–783. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76689-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76689-9)
- Natesh, R., Schwager, S. L. U., Sturrock, E. D., & Acharya, K. R. (2003). Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme–lisinopril complex. *Nature*, 421(6922), 551–554.

<https://doi.org/10.1038/nature01370>

- O'Mahony, J. A., & Fox, P. F. (2013). Milk Proteins: Introduction and Historical Aspects. In *Advanced Dairy Chemistry* (pp. 43–85). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6_2
- Otte, J., Shalaby, S. M. A., Zakora, M., & Nielsen, M. S. (2007). Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. *International Dairy Journal*, 17(12), 1460–1472. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.04.008>
- Peñas, E., Restani, P., Ballabio, C., Préstamo, G., Fiocchi, A., & Gomez, R. (2006). Evaluation of the residual antigenicity of dairy whey hydrolysates obtained by combination of enzymatic hydrolysis and high-pressure treatment. *Journal of Food Protection*, 69(7), 1707–1712.
- Permyakov, E. a, & Berliner, L. J. (2000). α -Lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters*, 473(3), 269–274. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01546-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01546-5)
- Pessen, H., Purcell, J. M., & Farrell, H. M. (1985). Proton relaxation rates of water in dilute solutions of β -lactoglobulin. Determination of cross relaxation and correlation with structural changes by the use of two genetic variants of a self-associating globular protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 828(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(85\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0167-4838(85)90002-0)
- Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., & Korhonen, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *The Journal of Dairy Research*, 67(1), 53–64. [https://doi.org/Doi 10.1017/S0022029999003982](https://doi.org/Doi%2010.1017/S0022029999003982)
- Pihlanto Leppälä, A. (2000, September 10). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00003-6)
- Power, O., Fernández, A., Norris, R., Riera, F. A., & FitzGerald, R. J. (2014). Selective enrichment of bioactive properties during ultrafiltration of a tryptic digest of β -lactoglobulin. *Journal of Functional Foods*, 9(1), 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.002>
- Qin, B. Y., Bewley, M. C., Creamer, L. K., Baker, H. M., Baker, E. N., & Jameson, G. B. (1998). Structural basis of the tanford transition of bovine ??-lactoglobulin. *Biochemistry*, 37(40), 14014–14023. <https://doi.org/10.1021/bi981016t>
- Queiroz, I., Faro, C., & Pires, E. (1993). Specificity and kinetics of the milk-clotting enzyme from Cardoon (*Cynara cardunculus* L.) toward bovine κ -casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(10), 1537–1540. <https://doi.org/10.1021/jf00034a001>
- Rasband, W. (2015). ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, //imagej.nih.gov/ij/.
- Redington, J. M., Breydo, L., Almehdar, H. A., Redwan, E. M., & Uversky, V. N. (2016). α -Lactalbumin: Of camels and cows. *Protein and Peptide Letters*, (August). <https://doi.org/10.2174/0929866523666160517123738>

- Rojas, E., & Torres, G. (2013). Isolation and recovery of glycomacropeptide from milk whey by means of thermal treatment. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33(1), 14–20. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013005000027>
- Rutherford-Markwick, K. J., & Moughan, P. J. (2005). Bioactive peptides derived from food. *Journal of AOAC International*, 88(3), 955–966.
- Sagardia, I., Roa-Ureta, R. H., & Bald, C. (2013). A new QSAR model, for angiotensin I-converting enzyme inhibitory oligopeptides. *Food Chemistry*, 136, 1370–1376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.092>
- Sakurai, K., & Goto, Y. (2002). Manipulating monomer-dimer equilibrium of bovine β -lactoglobulin by amino acid substitution. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25735–25740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203659200>
- Sakurai, K., & Goto, Y. (2006). Dynamics and mechanism of the tanford transition of bovine β -lactoglobulin studied using heteronuclear NMR spectroscopy. *Journal of Molecular Biology*, 356(2), 483–496. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.038>
- Santos, V. N. C., De Freitas, R. A., Deschamps, F. C., & Biavatti, M. W. (2009). Ripe fruits of *Bromelia antiacantha*: investigations on the chemical and bioactivity profile. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy Abr*, 19(2A), 358–365.
- Sawyer, L. (2013). β -Lactoglobulin. In *Advanced Dairy Chemistry* (pp. 211–259). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6_7
- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
- Silva, M. R., Silvestre, M. P. C., Silva, V. D. M., Souza, M. W. S., Lopes Junior, C. O., Afonso, W. O., ... Rodrigues, D. F. (2014). Production of ace-inhibitory whey protein concentrate hydrolysates: Use of pancreatin and papain. *International Journal of Food Properties*, 17(5), 1002–1012. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.685821>
- Silvestre, M. P. C., Silva, M. R., Silva, V. D. M., de Souza, M. W. S., Lopes, C. de O., & Afonso, W. de O. (2012). Analysis of whey protein hydrolysates: Peptide profile and ACE inhibitory activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(4), 747–757. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502012000400019>
- Sociedad Uruguaya de Hipertensión Arterial. (2005). Hipertension Arterial. In *3er Consenso Uruguayo*.
- Sturrock, E. D., Anthony, C., & Danilov, S. (2013). Peptidyl-Dipeptidase A / Angiotensin I-Converting Enzyme. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 1, 480–494. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00098-3>
- Sturrock, E. D., Natesh, R., van Rooyen, J. M., & Acharya, K. R. (2004). What's new in the renin-angiotensin system? *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(21), 2677–2686. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4239-0>
- Tavares, T., Contreras, M. D. M., Amorim, M., Pintado, M., Recio, I., & Malcata, F. X. (2011). Novel

- whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes. *Peptides*, 32(5), 1013–1019. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.02.005>
- Tavares, T., & Malcata, F. X. (2013). *Whey Proteins as Source of Bioactive Peptides Against Hypertension*. INTECH Open Access Publisher.
- Teschemacher, H., Koch, G., & Brantl, V. (1997). Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers*, 43(2), 99–117. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(1997\)43:2<99::AID-BIP3>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(1997)43:2<99::AID-BIP3>3.0.CO;2-V)
- Thevananther, S., & Brecher, A. S. (1999). Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) binding protein from human serum with an ACE affinity column. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 77(3), 216–23.
- Thorn, D. C., Ecroyd, H., Carver, J. A., & Holt, C. (2015). Casein structures in the context of unfolded proteins. *International Dairy Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.07.008>
- Valdés, A., Cifuentes, A., & León, C. (2017, June 27). Foodomics evaluation of bioactive compounds in foods. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.06.004>
- Vallabha, V., & Tikku, P. K. (2013). Antihypertensive Peptides Derived from Soy Protein by Fermentation. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1007/s10989-013-9377-5>
- Vallés, D., & Cantera, A. M. B. (2015). Antiacanthain A and B: new proteases isolated from *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). In *XII Biotrans* (p. 335). Vienna.
- Vallés, D., Furtado, S., & Cantera, A. M. B. (2007). Characterization of new proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). *Enzyme and Microbial Technology*, 40(3), 409–413. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.011>
- Vazquez-Lara, L., Tello-Solis, S. R., Gomez-Ruiz, L., Garcia-Garibay, M., & Rodriguez-Serrano, G. M. (2003). Degradation of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin by actinidin. *Food Biotechnology*, 17(2), 117–128.
- Verheul, M., Pedersen, J. S., Roefs, S. P. F. M., & De Kruif, K. G. (1999). Association behavior of native ??-lactoglobulin. *Biopolymers*, 49(1), 11–20. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(199901\)49:1<11::AID-BIP2>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(199901)49:1<11::AID-BIP2>3.0.CO;2-1)
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., & Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *The British Journal of Nutrition*, 92(3), 357–66.
- Waeber, B., Brunner, H., Burnier, M., & Cohn, J. (2007). Hypertension. In J. T. Willerson, J. N. Cohn, H. Wellens, & D. Holmes (Eds.), *Cardiovascular Medicine Third Edition* (Tercera, pp. 1833–70). London: SpringerVerlag.
- WHO. (2013). *A global brief on hypertension*. WHO. World Health Organization. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.4815.882-a>

- Wu, J., Aluko, R. E., & Nakai, S. (2006). Structural Requirements of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides : Quantitative Structure – Activity Relationship Study of Di- and Tripeptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 732–738. <https://doi.org/10.1021/jf051263l>
- Xue, Y., Wu, C. Y., Branford-White, C. J., Ning, X., Nie, H. L., & Zhu, L. M. (2010). Chemical modification of stem bromelain with anhydride groups to enhance its stability and catalytic activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63(3–4), 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.01.018>
- Yoshikawa, M. (2015). Bioactive peptides derived from natural proteins with respect to diversity of their receptors and physiological effects. *Peptides*, 72, 208–225. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.013>
- Zimmerman, J. K., Barlow, G. H., & Klotz, I. M. (1970). Dissociation of beta-lactoglobulin near neutral pH. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 138(1), 101–109. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(70\)90289-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(70)90289-4)

APÉNDICE 1

Gráficos de Michaelis y Menten para la degradación de ALA y BLG con PepBA y papaína

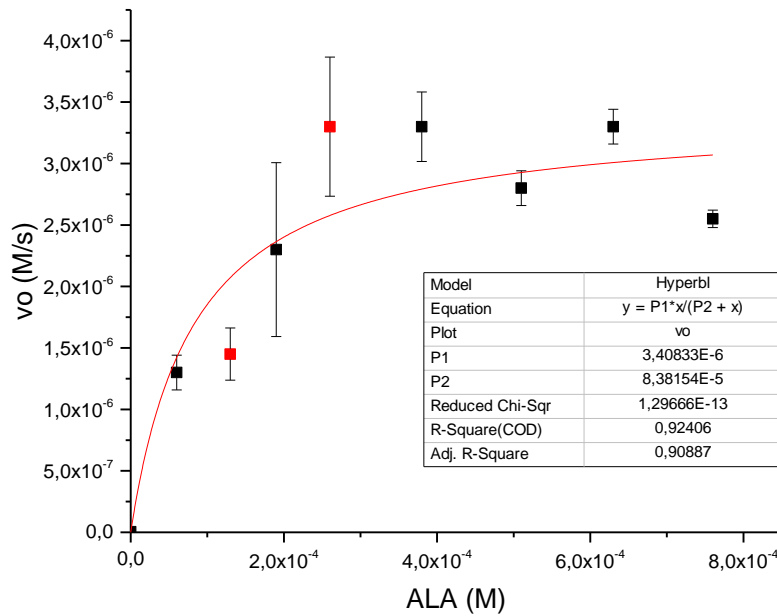


Figura 1. Gráfico de velocidad inicial (vo) en función de la concentración de ALA (gráfico Michaelis Menten) para la degradación de ALA a 50 °C y pH 4,5 con PepBA.

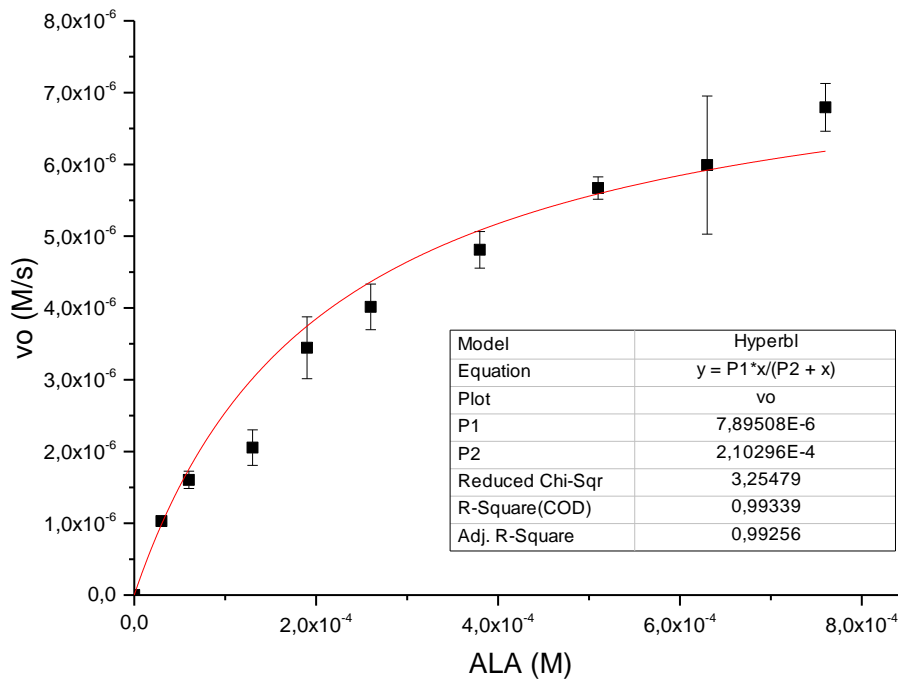


Figura 2. Gráfico de velocidad inicial (vo) en función de la concentración de ALA (gráfico Michaelis Menten) para la degradación de ALA a 50 °C y pH 7,5 con PepBA.

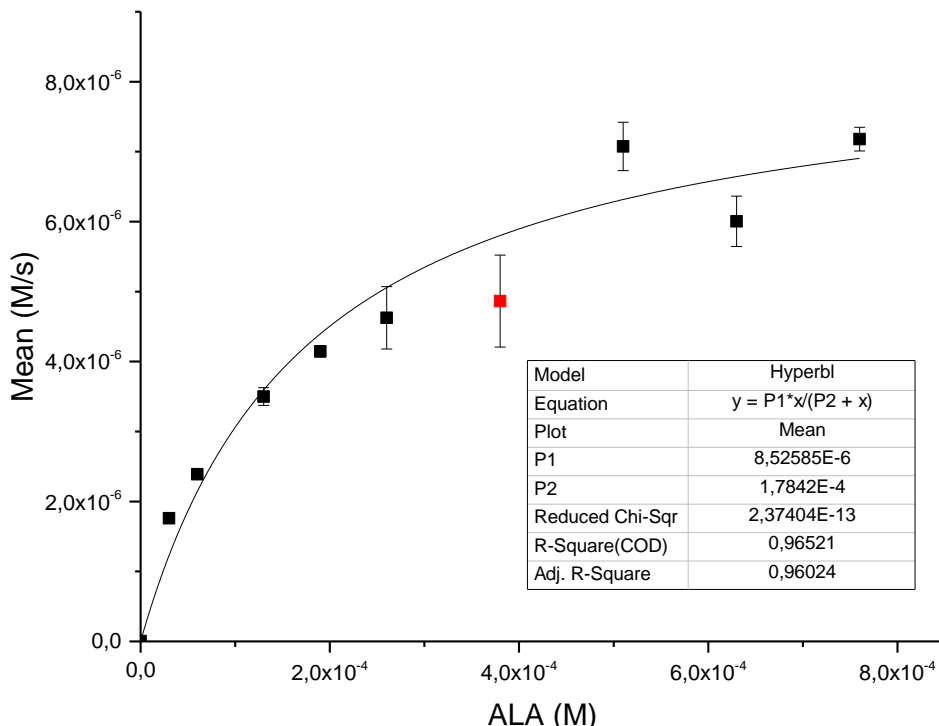


Figura 3. Gráfico de velocidad inicial (vo) en función de la concentración de ALA (gráfico Michaelis Menten) para la degradación de ALA a 50 °C y pH 9,2 con PepBA.

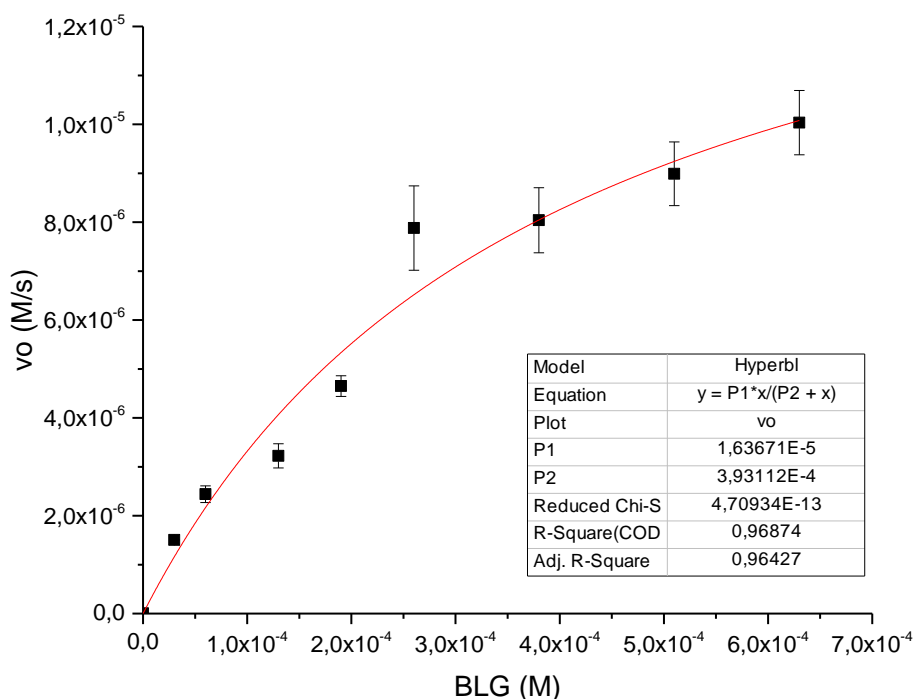


Figura 4. Gráfico de velocidad inicial (vo) en función de la concentración de ALA (gráfico Michaelis Menten) para la degradación de ALA a 50 °C y pH 4,5 con papaína.

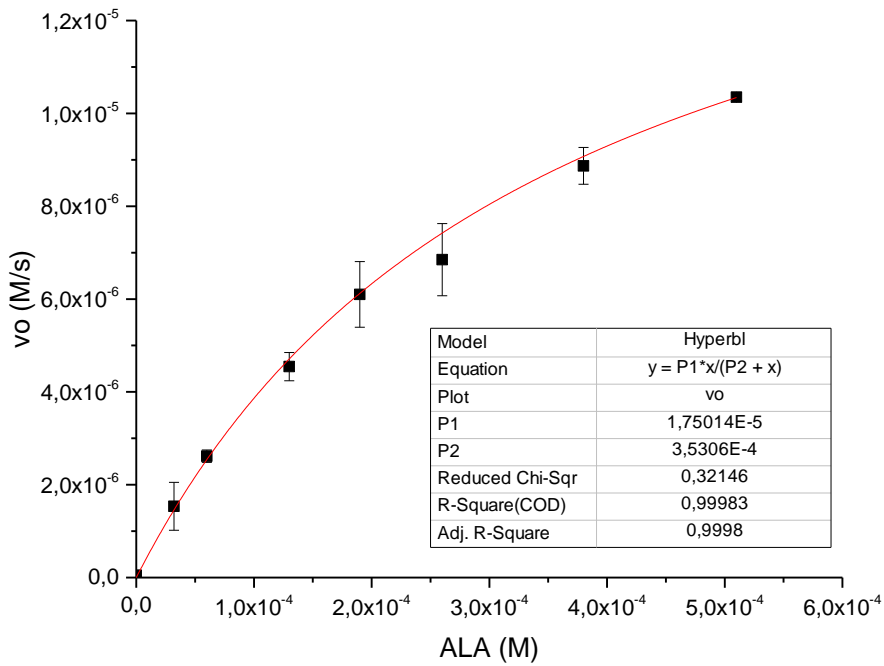


Figura 5. Gráfico de velocidad inicial (vo) en función de la concentración de ALA (gráfico Michaelis Menten) para la degradación de ALA a 50 °C y pH 7,5 con papaína.

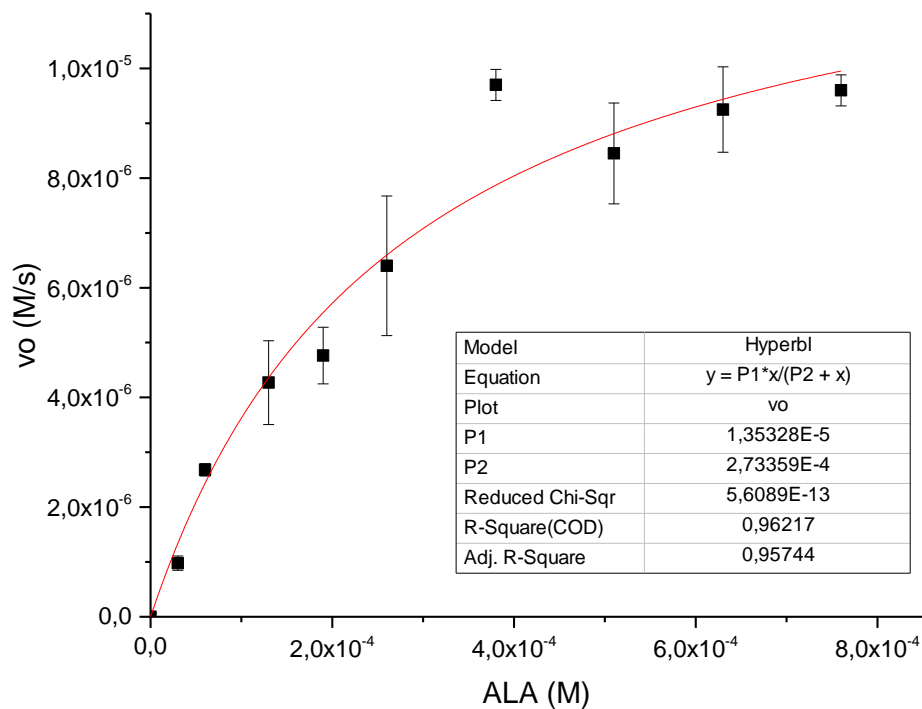


Figura 6. Gráfico de velocidad inicial (vo) en función de la concentración de ALA (gráfico Michaelis Menten) para la degradación de ALA a 50 °C y pH 9,2 con papaína.

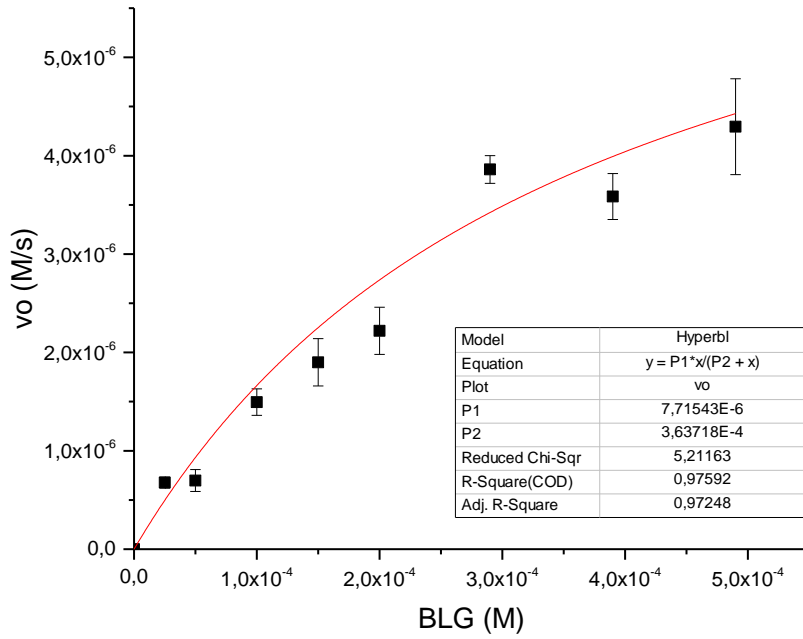


Figura 7. Gráfico de velocidad inicial (vo) en función de la concentración de BLG (gráfico Michaelis Menten) para la degradación de BLG a 50 °C y pH 7,5 con PepBA.

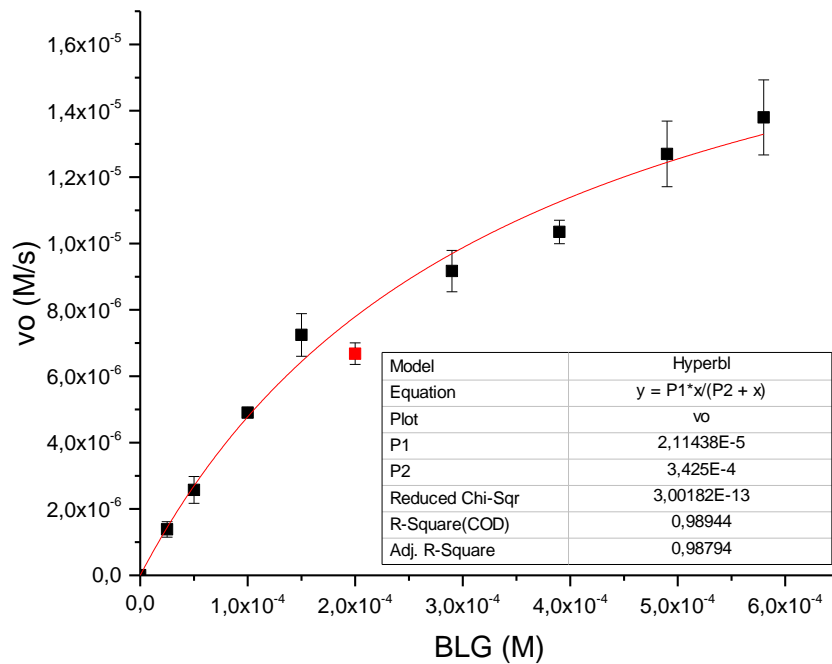


Figura 8. Gráfico de velocidad inicial (vo) en función de la concentración de BLG (gráfico Michaelis Menten) para la degradación de BLG a 50 °C y pH 9,2 con PepBA.

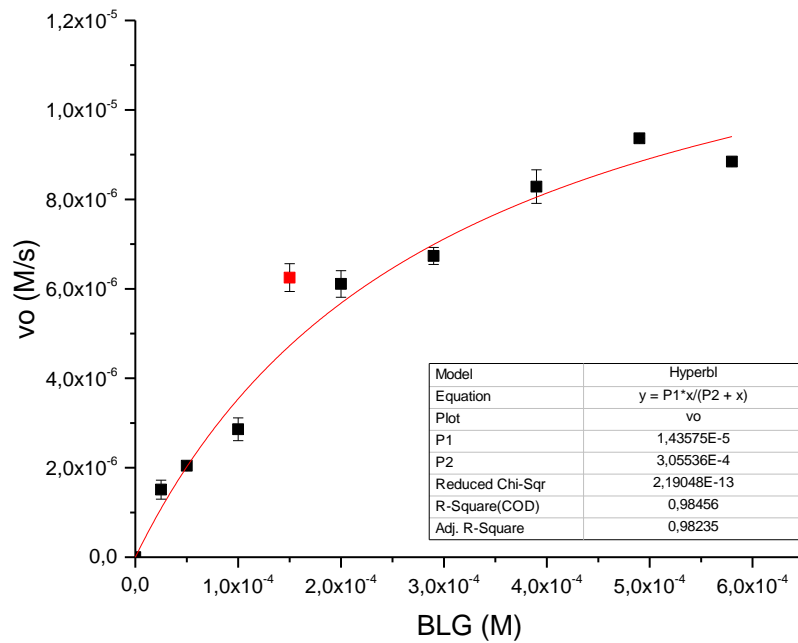


Figura 9. Gráfico de velocidad inicial (v_o) en función de la concentración de BLG (gráfico Michaelis Menten) para la degradación de BLG a 50 °C y pH 7,5 con papaína.

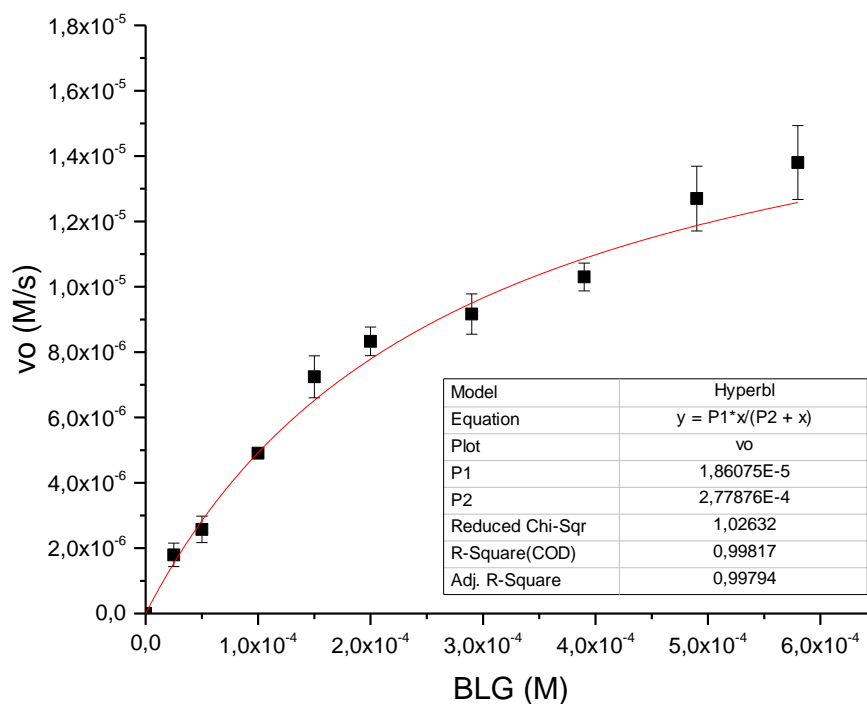
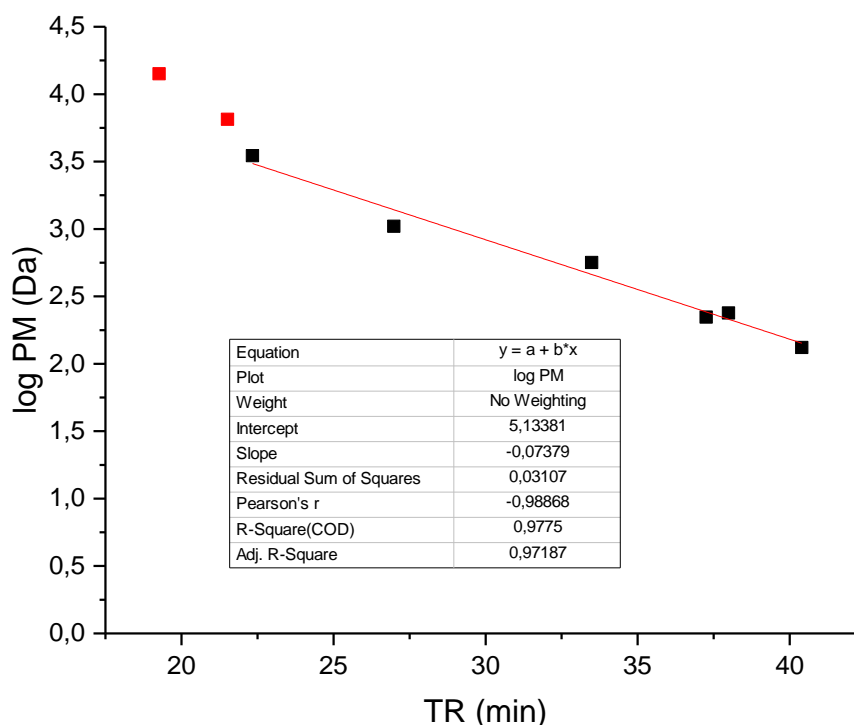


Figura 10. Gráfico de velocidad inicial (v_o) en función de la concentración de BLG (gráfico Michaelis Menten) para la degradación de BLG a 50 °C y pH 9,2 con papaína.

APÉNDICE 2

Calibración de columna Superdex Peptide 10/300 GL con estándares de masa molecular



Curva de calibración de estándares de masa molecular de columna Superdex™ Peptide 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) a temperatura ambiente. La separación se realizó en condiciones isocráticas usando una solución 30 % (v/v) acetonitrilo, 0,1 % ácido trifluoracético (TFA) en agua Milli Q con como fase móvil con un flujo de 0,5 mL/min durante 60 min (ver Sección 3.2.4).

La columna utilizada fue calibrada utilizando un estándar compuesto por: alfa lactalbumina (14.175 Da), aprotinina (6.512 Da), cadena beta de insulina oxidada (3495,9 Da), angiotensina II (1.046,2 Da), metionina-encefalina: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met (573,7 Da), Gly-Phe (222 Da), Gly-Tyr (238,2 Da) y Gly-Gly (132,12 Da).

APÉNDICE 3

Digestión gastrointestinal simulada del péptido GYDTQAIVQ

1. Se utilizó la herramienta de simulación teórica (BIOPEP: Enzymes action for your sequence) del tratamiento de la secuencia: GYDTQAIVQ con pepsina (pH 1,2), tripsina y quimotripsina A.

BIOPEP: Report of enzyme action

Results of enzyme action

GY - DTQA - IVQ

2. Se realizó la búsqueda de fragmentos activos entre los fragmentos resultantes del tratamiento enzimático simulado en la base de datos BIOPEP.

BIOPEP: Search for active fragments

No	Peptide ID	Sequence	Location	Name	Function	Activity	Monoisotopic mass	Chemical mass
1	3532	GY	[1-2]	ACE inhibitor	Inhibitor of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) (EC 3.4.15.1) (MEROPS ID: XM02-001)	ACE inhibitor	238.0840	238.2220
2	8788	GY	[1-2]	dipeptidyl peptidase IV inhibitor (DPP IV inhibitor)	Inhibitor of Dipeptidyl Peptidase IV (EC 3.4.14.5) (MEROPS ID: S09.003)	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	238.0840	238.2220
3	9045	IVQ	[7-9]	ACE inhibitor	Inhibitor of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) (EC 3.4.15.1) (MEROPS ID: M02-001)	ACE inhibitor	358.2100	358.4240

<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>

APÉNDICE 4

Cálculo de la constante de inhibición de los péptidos TTFHTSGY y DKVGINYWLAH a partir de gráficos de v_o en función de concentración de inhibidor [I]

Los gráficos de las FIGURAS 44A y 44B fueron ajustados a la siguiente ecuación:

$$v_o = \frac{V_{Max}[S]}{\frac{K_M}{K_i}[I] + K_M + [S]}$$

Utilizando el software OriginPro 2016 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) con:

$$y = \frac{A B}{C x + D}$$

$$A = V_{Max}; B = [S]; C = \frac{K_M}{K_i} \text{ y } D = K_M + [S]$$

Tabla 1. Ajuste no lineal del gráfico de v_o vs [TTFHTSGY] (FIGURA 44A).

	A	B	C	D
1	Equation	y = A*B/(C*x+ D)		
2	Adj. R-Square	0,99131		
3			Value	Standard Error
4	vo	A	19,54215	0,59548
5	vo	B	0,6	0
6	vo	C	0,00878	8,68349E-4
7	vo	D	1,05	0

Tabla 2. Ajuste no lineal del gráfico de v_o vs [DKVGINYWLAH] (FIGURA 44B).

	A	B	C	D
1	Equation	y = A*B/(C*x+ D)		
2	Adj. R-Square	0,98521		
3			Value	Standard Error
4	vo	A	54,66369	2,07747
5	vo	B	0,9	0
6	vo	C	0,03904	0,00444
7	vo	D	1,35	0

APÉNDICE 5

Cálculo de la constante de inhibición de los péptidos TTFHTSGY y DKVGINYWLAH a partir de gráficos de Cornish Bowden

Los gráficos de las Figuras 47 y 48 fueron ajustados a la siguiente ecuación:

$$\frac{[S]}{v_o} = \frac{K_{Map}}{K_i V_{Max}} [I] + \frac{K_{Map} + [S]}{V_{Max}}$$

A partir de la pendiente se calculó la constante de inhibición (K_i) según:

$$K_i = \frac{K_M}{pendiente V_{Max}}$$

Tabla 1. Ajuste lineal del gráfico de $[S]/v_o$ vs $[TTFHTSGY]$ (gráficos de Cornish Bowden, FIGURA 47).

	A	B1	C1	C2
1	Equation	y = a + b*x		
2	Plot	[S]/vo	[S]/vo	[S]/vo
3	Weight	No Weighting		
4	Intercept	0,02167 ± 0,00372	0,03725 ± 0,00555	0,04299 ± 0,00215
5	Slope	2,4029E-4 ± 3,21174E-5	2,41796E-4 ± 4,79436E-5	2,3455E-4 ± 1,80999E-5
6	Residual Sum of Squares	7,03088E-5	1,56672E-4	7,09816E-6
7	Pearson's r	0,97423	0,94578	0,99704
8	R-Square(COD)	0,94913	0,8945	0,99408
9	Adj. R-Square	0,93217	0,85933	0,98816

Tabla 2. Ajuste lineal del gráfico de $[S]/v_o$ vs $[DKVGIGNYWLAH]$ (gráficos de Cornish Bowden, FIGURA 48).

	A	B1	B2	B3
1	Equation	y = a + b*x		
2	Plot	[S]/vo	[S]/vo	[S]/vo
3	Weight	No Weighting		
4	Intercept	0,00977 ± 0,0014	0,02224 ± 0,00139	0,04119 ± 0,00315
5	Slope	6,38321E-4 ± 3,05815E-5	6,63741E-4 ± 3,0338E-5	5,73183E-4 ± 6,87195E-5
6	Residual Sum of Squares	6,5466E-6	6,44278E-6	3,30566E-5
7	Pearson's r	0,99771	0,99792	0,98593
8	R-Square(COD)	0,99543	0,99584	0,97206
9	Adj. R-Square	0,99315	0,99376	0,95808

ANEXO 1

Espectros de masas (MALDI-TOF/TOF) de fracciones del HLS separadas por SEC en columna Sephadex G-25 (pools A, B, D y H)

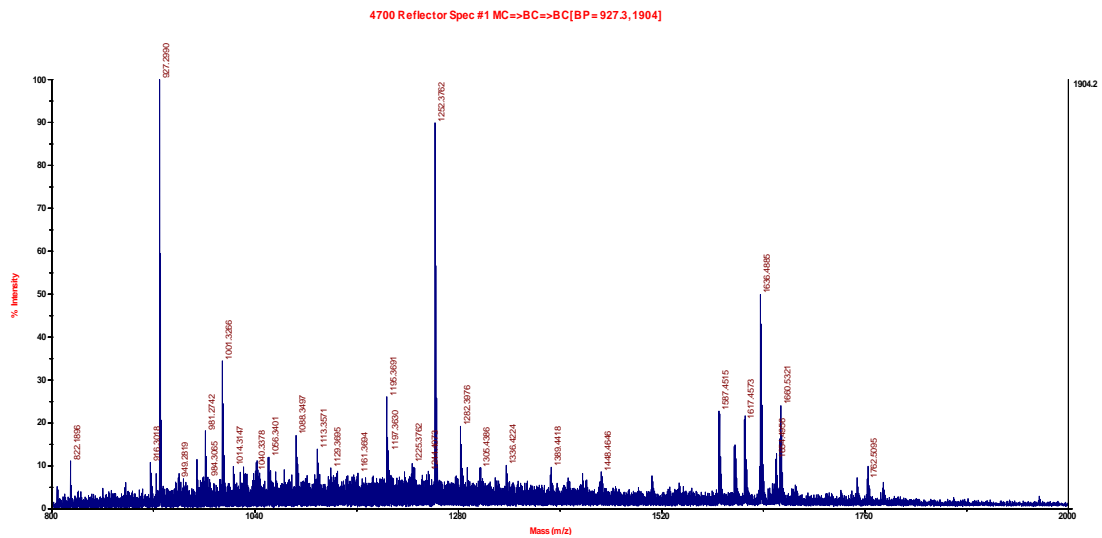


Figura 1. Espectro de masas de pool A.

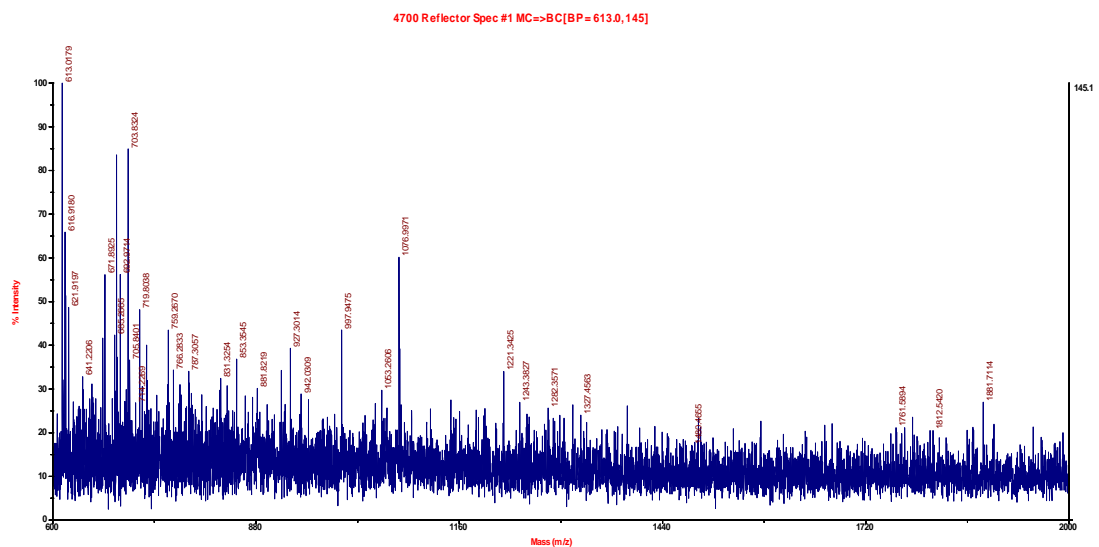


Figura 2. Espectro de masas de pool B.

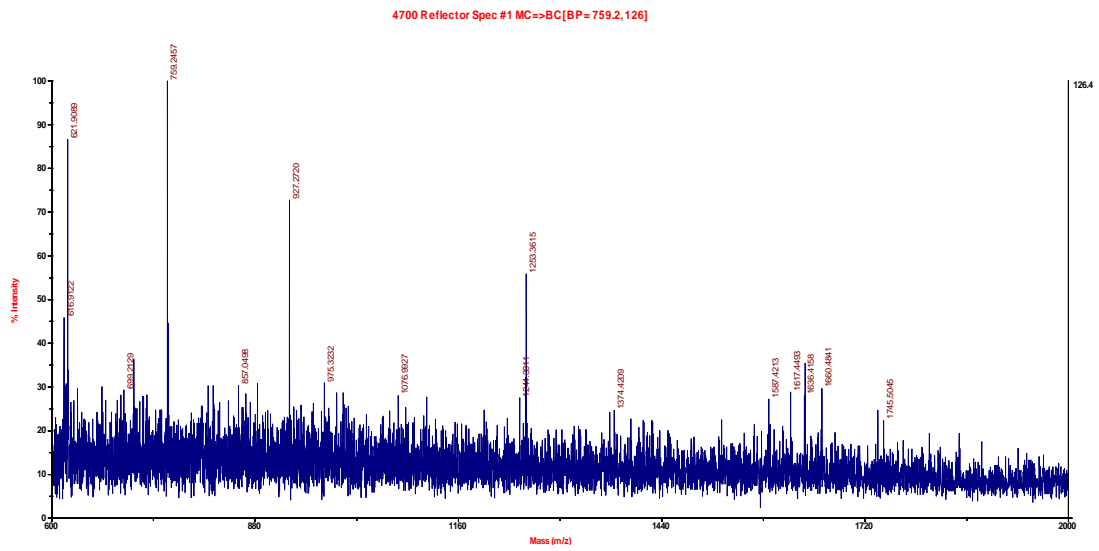


Figura 2. Espectro de masas de pool D.

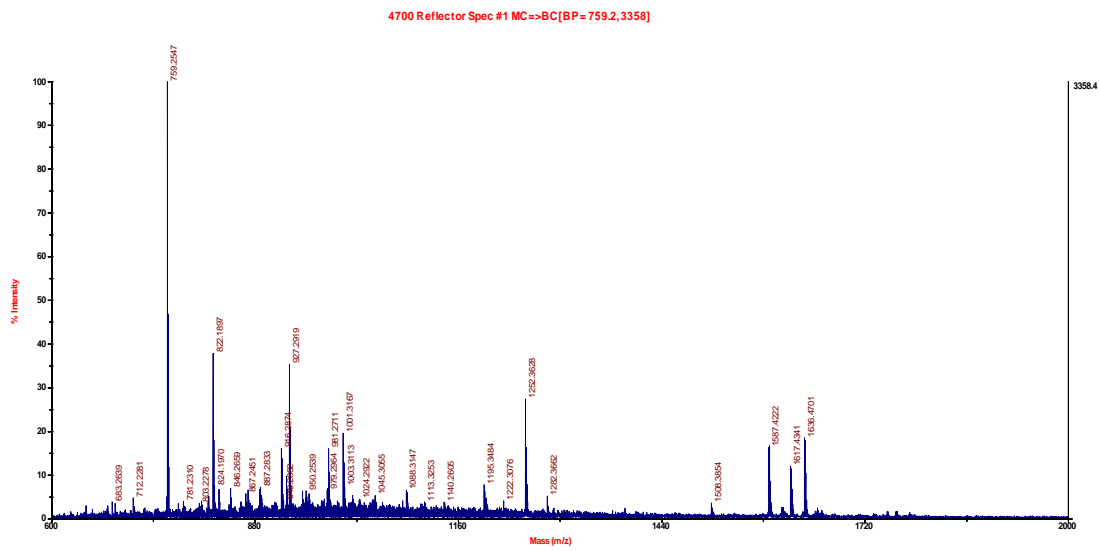


Figura 2. Espectro de masas de pool H.

ANEXO 2

Informe de identificación de secuencias de péptidos derivados de ALA purificados por cromatografía de afinidad

BUSQUEDAS EN BASES DE DATOS PÚBLICAS

▼ Search parameters

Type of search	: MS/MS Ion Search
Enzyme	: None
Variable modifications	: <input checked="" type="checkbox"/> Oxidation (M)
Mass values	: Monoisotopic
Protein mass	: Unrestricted
Peptide mass tolerance	: ± 1.5 Da
Fragment mass tolerance	: ± 1 Da
Max missed cleavages	: 0
Instrument type	: ESI-TRAP
Number of queries	: 15,152

Significance threshold 0.05

Ions score cut off 52

Muestra: ALA-E1-B

http://ubypa8/mascot/cgi/master_results_2.pl?file=20140524%2FF007683.dat#0:pr.eh=1p.1

LALBA_Bovin

Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Score	Peptide
915.5282	915.4603	0.0679	54	G.INYWLAH.K
1155.4001	1155.4833	-0.0832	55	T.TFHTSGYDTQ.A
1286.8700	1286.5415	0.3285	69	Q.NNDSTEYGLFQ.I
1467.1347	1465.6838	1.4510	54	T.FHTSGYDTQAIVQ.N
1566.6239	1566.7315	-0.1076	78	T.TFHTSGYDTQAIVQ.N

CASA1_BOVIN

Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Score	Peptide
1098.7176	1098.6033	0.1143	60	Q.EVLNENLLR.F
1633.5567	1632.7631	0.7936	56	S.FSDIPNPIGSENSEK.T
2103.3482	2103.9596	-0.6114	114	Y.TDAPSFSDIPNPIGSENSEK.T
2861.9364	2862.3559	-0.4195	52	Y.VPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEK.T

CASAB_BOVIN

Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Score	Peptide
1270.2957	1269.7081	0.5876	62	L.LYQEPVLPVVR.G
1383.1219	1382.7922	0.3298	72	F.LLYQEPVLPVVR.G

Muestra: ALA-E1-E

http://ubypa8/mascot/cgi/master_results_2.pl?file=20140524%2FF007684.dat

LALBA_Bovin

Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Score	Peptide
912.41	912.39	0.0154	57	C.TTFHTSGY.D
914.95	915.46	-0.5022	51	G.INYWLAH.K
992.74	993.47	-0.7337	53	S.GYDTQAIVQ.N
1080.83	1080.50	0.3224	58	T.SGYDTQAIVQ.N
1286.75	1286.54	0.2132	68	Q.NNDSTEYGLFQ.I
1319.17	1318.61	0.5625	53	F.HTSGYDTQAIVQ.N
1567.29	1566.73	0.5610	68	T.TFHTSGYDTQAIVQ.N
1668.16	1667.77	0.3896	58	C.TTFHTSGYDTQAIVQ.N

CASA1_BOVIN

Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Score	Peptide
1758.85	1758.93	-0.0850	56	K.HQGLPQEVLNENLLR.F
2104.99	2103.95	1.0380	101	Y.TDAPSFSDIPNPIGSENSEK.T
2863.08	2862.35	0.7329	84	Y.VPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEK.T

CASB_BOVIN

Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Score	Peptide
1270.0147	1269.7081	0.3066	63	L.LYQEPVLPVVR.G
1383.0948	1382.7922	0.3027	63	F.LLYQEPVLPVVR.G

HBBF_BOVIN

Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Score	Peptide
1214.0272	1213.6303	0.3969	83	K.VDEVGGEALGRL.L

BUSQUEDAS EN BASES DE DATOS LOCALES

ALA-E1-B

http://ubypa8/mascot/cgi/master_results_2.pl?file=20140522%2FF007663.dat;_ignoreionsscorebelow=0.05;sigthreshold=0.05;report=0#1:pr.eh=

Type of search : MS/MS Ion Search
 Enzyme : None
 Variable modifications : Oxidation (M)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein mass : Unrestricted
 Peptide mass tolerance : ± 1.5 Da
 Fragment mass tolerance : ± 1 Da
 Max missed cleavages : 1
 Instrument type : ESI-TRAP
 Number of queries : 13,740

Significance threshold 0.05

Ions score cut off 35

	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Score	Peptide
▶1	747.5632	747.3915	0.1716	38	G.LFQINN.K
▶8	771.9004	771.4854	0.4149	47	K.KILDKVG.I
	802.5431	802.3762	0.1669	36	X.NYWLAH.K
▶7	915.5282	915.4603	0.0679	54	I.INYWLAH.K
▶1	916.9929	916.4191	0.5738	51	I.NNYWLAH.K
▶3	971.6715	972.4817	-0.8102	50	G.IGNYWLAH.K
	986.8774	986.4974	0.3800	39	G.IANYWLAH.K
	1016.6811	1016.5080	0.1732	36	G.ITNYWLAH.K
▶1	1054.4234	1054.4356	-0.0122	42	T.FHTSGYDTQ.A
	1079.9605	1080.5451	-0.5846	39	T.SGYDTQAIKV.Q
	1135.2267	1135.5451	-0.3184	35	V.GIYNYWLAH.K
▶1	1155.4001	1155.4833	-0.0832	55	T.TFHTSGYDTQ.A
	1159.1119	1158.5822	0.5297	36	K.VGISNYWLAH.K
▶3	1286.8700	1286.5415	0.3285	62	Q.NNDSTEYGLFQ.I
	1300.5272	1300.6928	-0.1656	37	D.KVGITNYWLAH.K
	1466.3202	1465.7202	0.6000	39	T.FHTSGYDTQAIKV.Q
▶1	1467.1347	1465.6838	1.4510	42	T.FHTSGYDTQAIQV.Q
	1467.2450	1466.6678	0.5772	47	T.FHTSGYDTQAIQV.Q
▶2	1566.6239	1566.7678	-0.1439	52	T.TFHTSGYDTQAIKV.Q
	1669.2364	1667.8155	1.4209	38	C.TFHTSGYDTQAIKV.Q

ALA-E1-E

http://ubypa8/mascot/cgi/master_results_2.pl?file=20140522%2FF007677.dat

Type of search : MS/MS Ion Search
 Enzyme : None
 Variable modifications : Oxidation (M)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein mass : Unrestricted
 Peptide mass tolerance : ± 1.5 Da
 Fragment mass tolerance : ± 1 Da
 Max missed cleavages : 1
 Instrument type : ESI-TRAP
 Number of queries : 13,740

Significance threshold 0.05

Ions score cut off 35

	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Score	Peptide
▶3	747.4834	747.3915	0.0919	41	G.LFQINN.K
▶2	771.9928	771.4854	0.5073	37	K.KILDKVG.I
▶6	811.2100	811.3501	-0.1400	41	T.TFHTSGY.D
	825.0261	825.3293	-0.3033	37	T.FHTSGYD.T
▶2	912.4132	912.3978	0.0154	57	C.TTFHTSGY.D
	914.9581	915.4603	-0.5022	51	I.INYWLAH.K
▶2	926.7511	926.3770	0.3741	43	T.TFHTSGYD.T
	992.7249	993.5131	-0.7882	37	S.GYDTQAIKV.Q
	992.7431	993.4767	-0.7337	39	S.GYDTQAIQV.Q
	1027.1617	1027.4247	-0.2630	37	C.TTFHTSGYD.T
▶2	1053.8431	1054.4356	-0.5925	41	T.FHTSGYDTQ.A
▶4	1080.8311	1080.5451	0.2860	57	T.SGYDTQAIKV.Q
▶8	1286.7547	1286.5415	0.2132	68	Q.NNDSTEYGLFQ.I
	1372.4372	1371.6935	0.7436	45	L.DKVGIGNYWLAH.K
	1567.2924	1566.7678	0.5246	56	T.TFHTSGYDTQAIKV.Q
▶1	1667.0194	1667.8155	-0.7961	44	C.TTFHTSGYDTQAIKV.Q

ANEXO 3

Reporte del análisis de los péptidos sintéticos



Data Analysis Report

Peptide Name	1
Sequence	TTFHTSGY
M.W. (Theoretical)	912.96 g/mol
Reference No.	79574-001
% of Hydrophobic amino acids	12.5%
% of Acidic amino acids	0%
% of Basic amino acids	12.5%
% of Neutral amino acids	75%

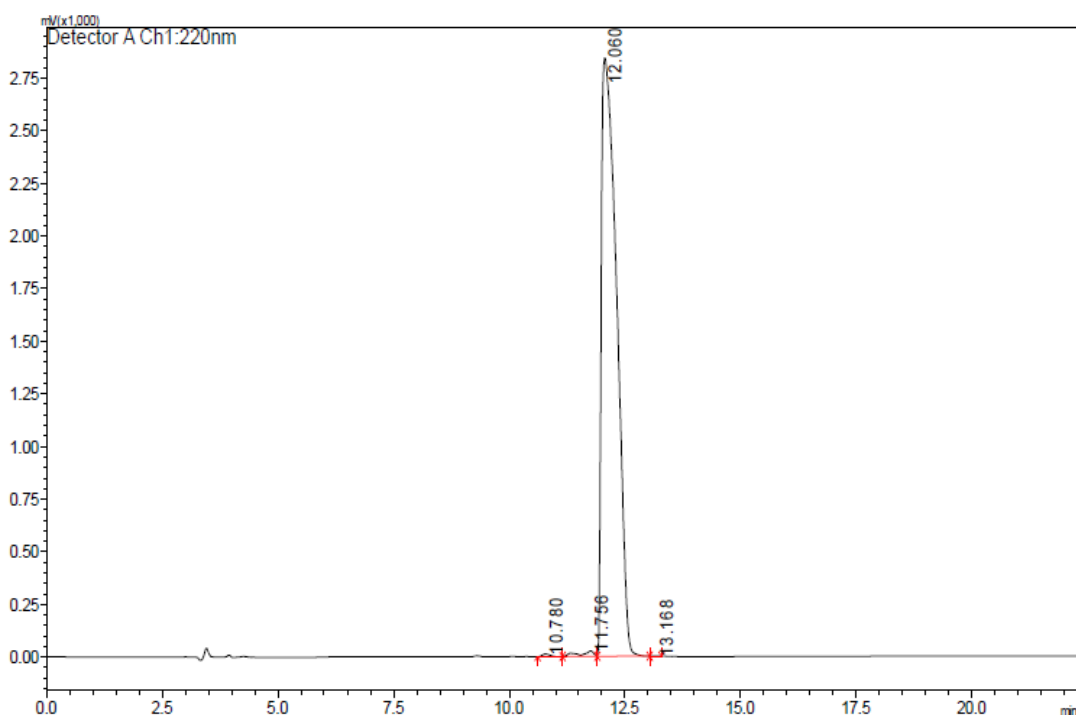
Test	Results
Appearance	Lyophilized material
Amount	40.0 mg
MS (M+H⁺)	914.87 (see raw data enclosed)
MS (M+Na⁺)	937.11
MS (M+K⁺)	
Purity (HPLC)	98.97% (HPLC, 220 nm, C18, linear gradient) (see raw data enclosed)
Storage Conditions	-20 °C
Remarks	This product is supplied as trifluoroacetate salt

Use recommended within 6 months from manufacturing date

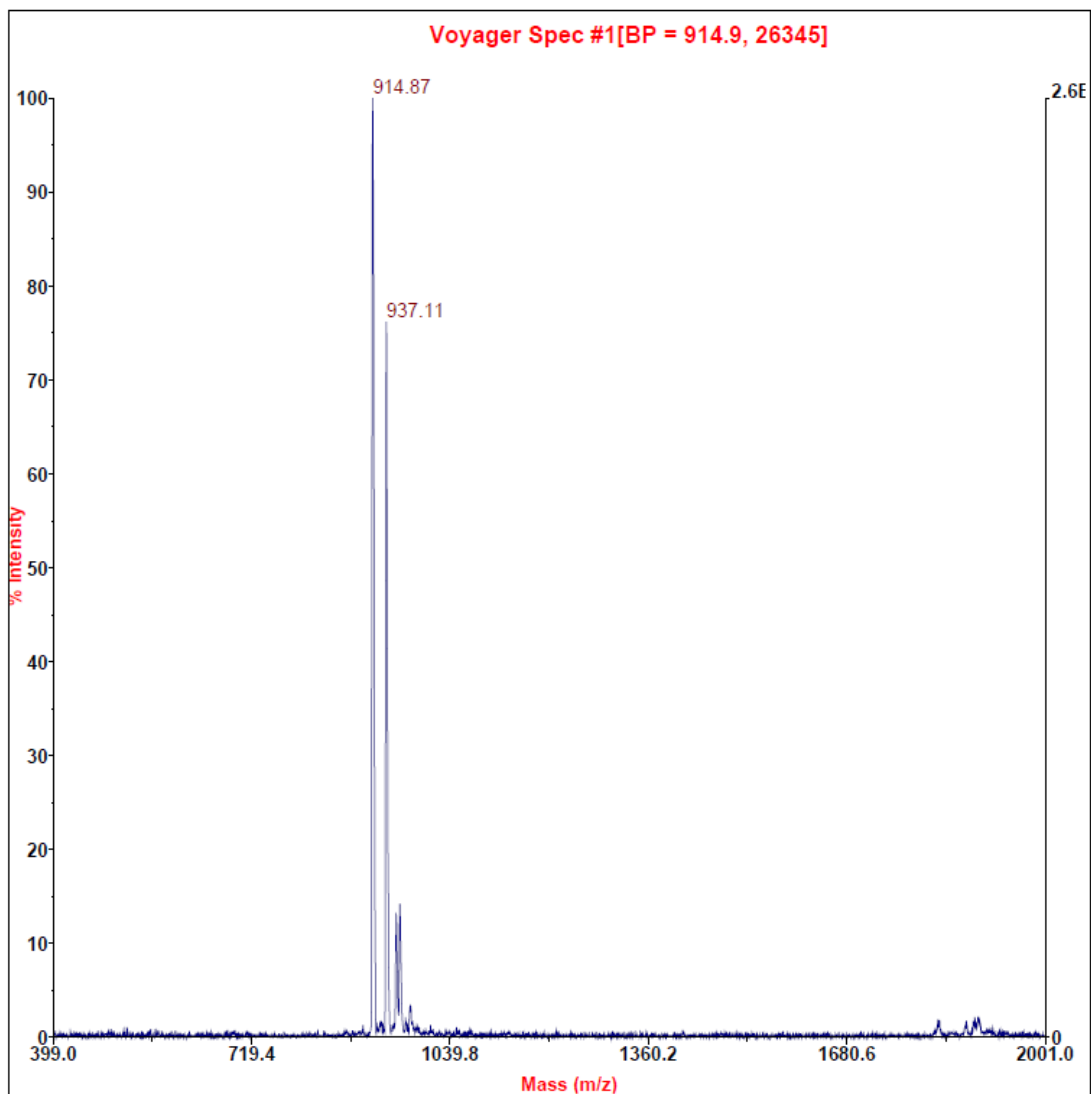
(Analytical Data see next pages)

HPLC Data

HPLC Column Merck (250×4.6mm I.D.) C18
 Detection wavelength 220 nm
 Gradient 10-32%B in 22 min
 Buffer A 0.05%TFA in H₂O
 Buffer B 0.05%TFA in 90% CH₃CN
 Gradient A B
 0.01 min 90% 10%
 22.0 min 68% 32%
 22.1 min 0% 100%
 32.0 min STOP



PeakTable				
Detector A Ch1 220nm				
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Height
1	10.780	125474	0.191	11201
2	11.756	537538	0.820	25346
3	12.060	64865545	98.973	2842349
4	13.168	10121	0.015	1123
Total		65538678	100.000	

MS Data



Data Analysis Report

Peptide Name	2
Sequence	GYDTQAIVQ
M.W. (Theoretical)	994.08 g/mol
Reference No.	79574-002
% of Hydrophobic amino acids	33.33%
% of Acidic amino acids	11.11%
% of Basic amino acids	0%
% of Neutral amino acids	55.56%

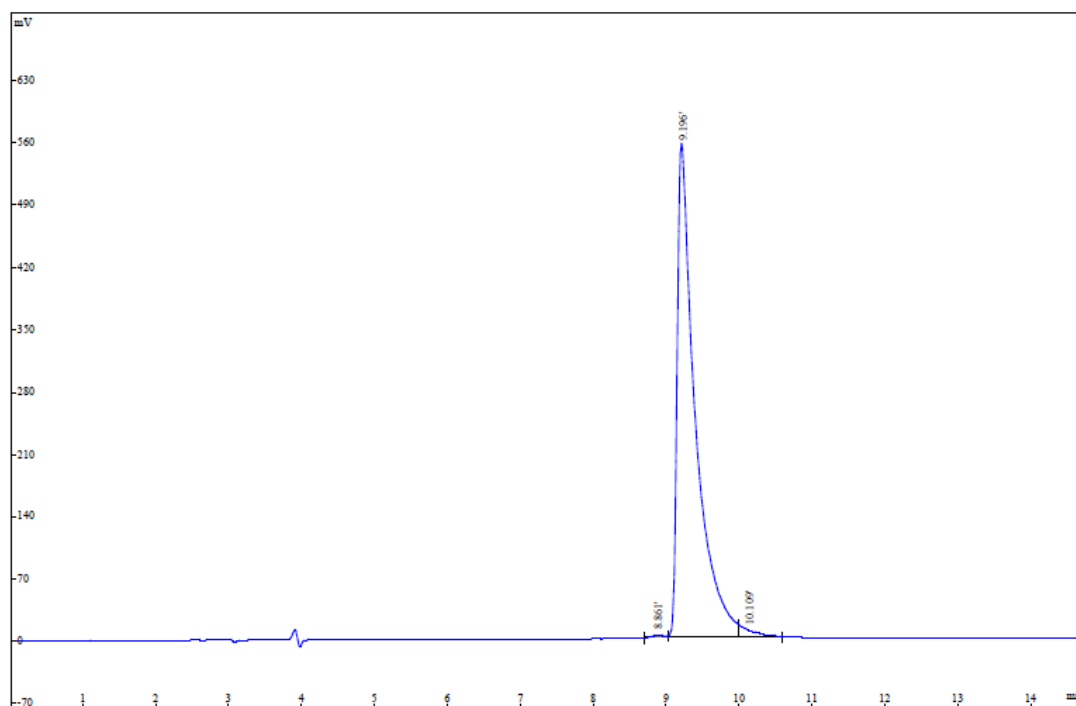
Test	Results
Appearance	Lyophilized material
Amount	40.0 mg
MS (M+H⁺)	995.90 (see raw data enclosed)
MS (M+Na⁺)	1017.65
MS (M+K⁺)	
Purity (HPLC)	98.03% (HPLC, 220 nm, C18, linear gradient) (see raw data enclosed)
Storage Conditions	-20 °C
Remarks	This product is supplied as trifluoroacetate salt

Use recommended within 6 months from manufacturing date

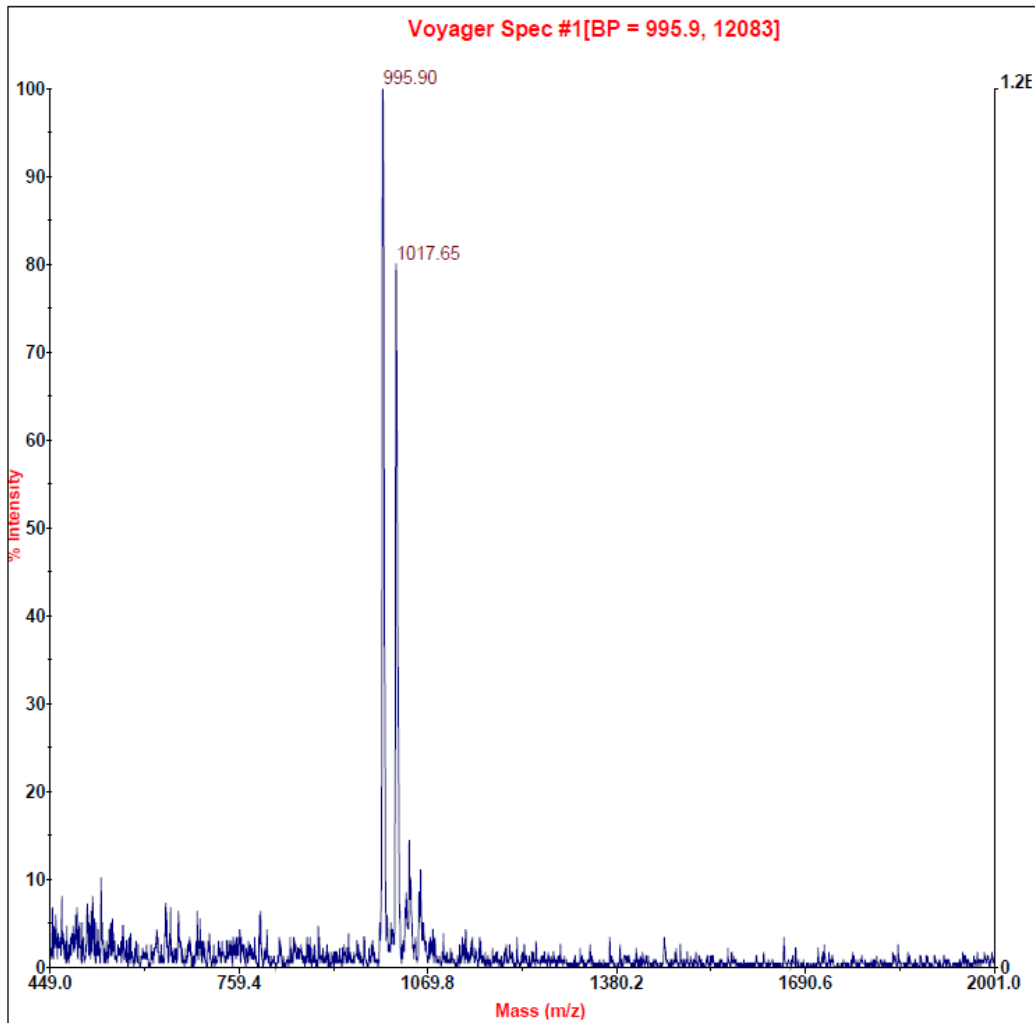
(Analytical Data see next pages)

HPLC Data

HPLC Column	Merck (250×4.6mm I.D.) C18	
Detection wavelength	220 nm	
Gradient	15-30%B in 15 min	
Buffer A	0.05%TFA in	H ₂ O
Buffer B	0.05%TFA in	90% CH ₃ CN
Gradient	A	B
0.01 min	85%	15%
15.0 min	70%	30%
15.1 min	0%	100%
25.0 min	STOP	

**Peak Results**

Rank	Time	Name	Conc.	Area	Height
1	8.861		0.3824	37296	3202
2	9.196		98.03	9560378	554853
3	10.109		1.582	154306	7831
Total			100	9751980	565886

MS Data



Data Analysis Report

Peptide Name	3
Sequence	DKVGIGNYWLAH
M.W. (Theoretical)	1372.56 g/mol
Reference No.	79574-003
% of Hydrophobic amino acids	41.67%
% of Acidic amino acids	8.33%
% of Basic amino acids	16.67%
% of Neutral amino acids	33.33%

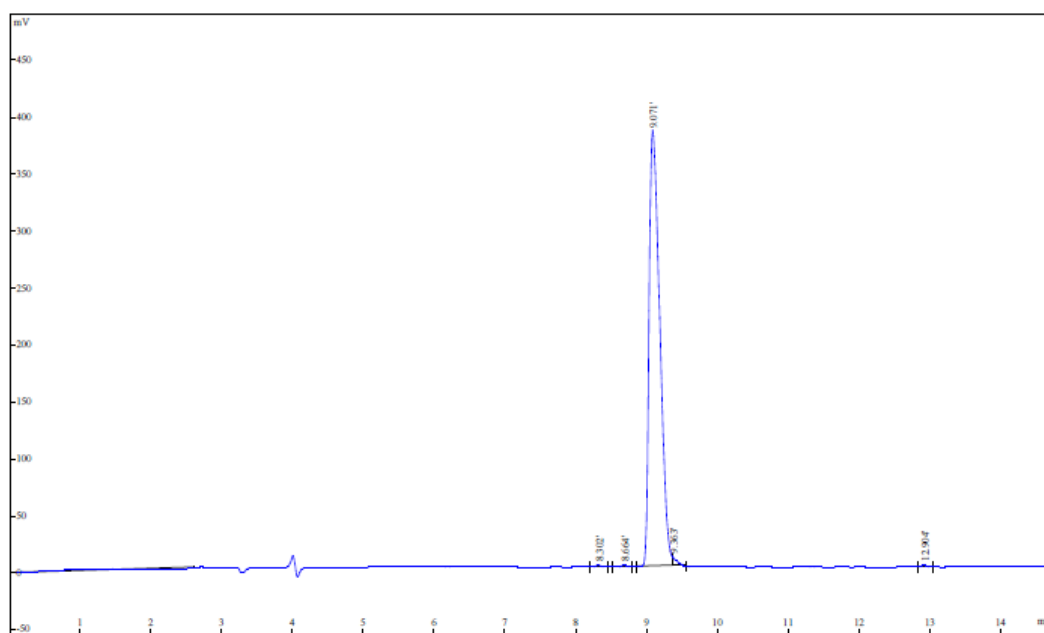
Test	Results
Appearance	Lyophilized material
Amount	40.0 mg
MS (M+H ⁺)	1372.95 (see raw data enclosed)
MS (M+Na ⁺)	1394.58
MS (M+K ⁺)	
Purity (HPLC)	98.51% (HPLC, 220 nm, C18, linear gradient) (see raw data enclosed)
Storage Conditions	-20 °C
Remarks	This product is supplied as trifluoroacetate salt

Use recommended within 6 months from manufacturing date

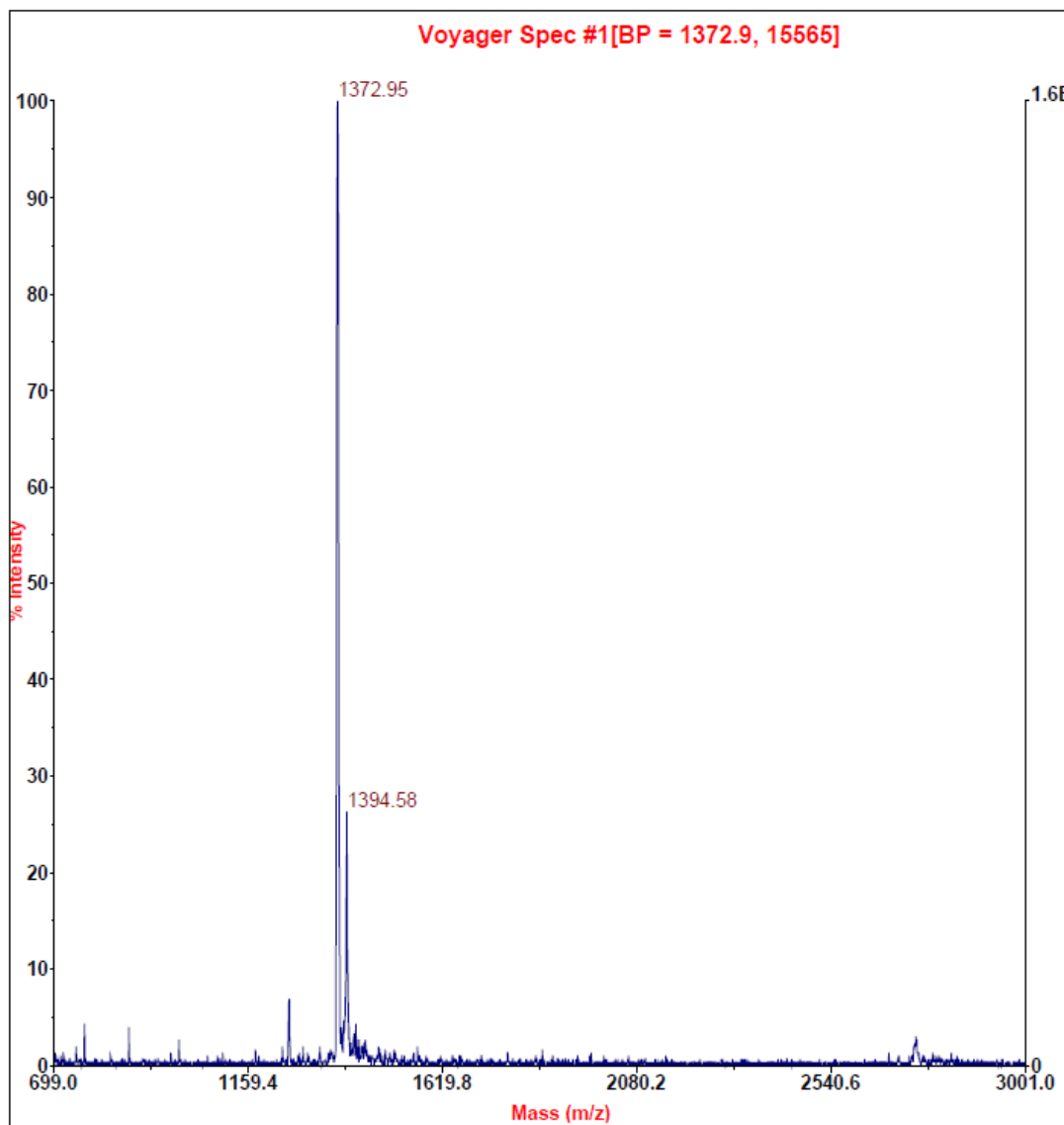
(Analytical Data see next pages)

HPLC Data

HPLC Column Merck (250×4.6mm I.D.) C18
 Detection wavelength 220 nm
 Gradient 20-35%B in 15 min
 Buffer A 0.05%TFA in H₂O
 Buffer B 0.05%TFA in 90% CH₃CN
 Gradient A B
 0.01 min 80% 20%
 15.0 min 65% 35%
 15.1 min 0% 100%
 25.0 min STOP

**Peak Results**

Rank	Time	Name	Conc.	Area	Height
1	8.302		0.2365	9646	1595
2	8.664		0.2216	9039	1547
3	9.071		98.51	4018152	383427
4	9.363		0.7888	32177	7228
5	12.904		0.2498	10191	1786
Total			100	4079205	395583

MS Data

ANEXO 4

Valores de IC₅₀ y secuencias de péptidos inhibidores de ECA-I derivados de ALA depositados en BIOPEP

<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>

ID of protein: 1115 alpha-lactalbumin, gen. var. B, precursor, bovine (Bos taurus)

Protein sequence:

MMSFVSLLLVGLFHATQAEQLTKCEVFRELKDLKGYGGVSLPEWVCTTFHTSGYDTQAIQNNNDSTEYGLFQINN
KIWCKDDQNPHSSNICNISCDFLDDDLTDDIMCVKKILDKVGINYWLAHKALCSEKLDQWLCEKL

ID	Name of peptide	Number	Sequence	Location	IC 50 μ M
3384	ACE inhibitor	1	VF	[27-28]	9,2
3488	ACE inhibitor from sake lees	1	YW	[122-123]	10,5
3514	ACE inhibitor (a-La 105-110)	1	LAHKAL	[124-129]	621
3532	ACE inhibitor	2	GY	[36-37],[54-55]	210
3551	ACE inhibitor (from bovine beta-Lg)	2	LF	[13-14],[71-72]	349
3553	ACE inhibitor	2	YG	[37-38],[69-70]	1523
3554	a-lactokinin (a-La 50-53) ACE inhibitor	1	YGLF	[69-72]	733
3970	ACE inhibitor (fragment of a-lactalbumin: 104-108)	1	WLAHK	[123-127]	77
3971	ACE inhibitor (fragment of bovine a-La)	1	VGINYWLAHK	[118-127]	327
3973	ACE inhibitor (from bovine a-La)	1	YGL	[69-71]	409
7544	ACE inhibitor	1	IW	[78-79]	4,7
7558	ACE inhibitor from buckwheat	1	VK	[111-112]	13
7585	ACE inhibitor	1	LA	[124-125]	310
7592	ACE inhibitor	1	FR	[28-29]	920
7594	ACE inhibitor	2	VG	[10-11],[118-119]	1100
7596	ACE inhibitor	2	GI	[11-12],[119-120]	1200
7599	ACE inhibitor	1	GL	[70-71]	2500
7604	ACE inhibitor	1	KG	[35-36]	3200
7608	ACE inhibitor	1	GV	[39-40]	4600
7616	ACE inhibitor	1	GG	[38-39]	7200
7618	ACE inhibitor	1	SG	[53-54]	8500
7647	ACE inhibitor	1	YGG	[37-39]	1001
7682	ACE inhibitor from garlic	1	NY	[121-122]	32,6
7685	ACE inhibitor from garlic	1	SF	[3-4]	130,2

7692	ACE inhibitor	1	KF	[98-99]	28,3
7693	ACE inhibitor from wakame	2	KL	[133-134],[141-142]	50,2
7698	ACE inhibitor from wakame	1	NK	[76-77]	810
7743	ACE inhibitor	1	KA	[127-128]	31,5
7752	ACE inhibitor from shark meat hydrolysate	1	EY	[68-69]	2,68
7828	ACE inhibitor	1	EV	[26-27]	nd
7830	ACE inhibitor	1	TE	[67-68]	nd
7834	ACE inhibitor	2	TQ	[17-18],[57-58]	nd
7835	ACE inhibitor	1	AH	[125-126]	nd
7838	ACE inhibitor	1	EW	[44-45]	nd
7840	ACE inhibitor	2	EK	[132-133],[140-141]	nd
7843	ACE inhibitor	1	PH	[86-87]	nd
7844	ACE inhibitor	1	HK	[126-127]	nd
8185	ACE inhibitor	1	TF	[49-50]	18
8193	ACE inhibitor	1	AI	[59-60]	3,41
9045	ACE inhibitor	1	IVQ	[60-62]	95,5
9076	ACE inhibitor	1	FQ	[72-73]	51,29
9079	ACE inhibitor	2	IL	[12-13],[114-115]	54,95
9085	ACE inhibitor	1	MM	[1-2]	547,5
9107	ACE inhibitor	2	WL	[123-124],[137-138]	41,4
9111	ACE inhibitor	1	DKVGINY	[116-122]	84,2
9113	ACE inhibitor	1	KGYGGVSL	[35-42]	253,6
9114	ACE inhibitor	1	DKVGINYW	[116-123]	25,2
9115	ACE inhibitor	1	KGYGGVSLPEW	[35-45]	0,8
9184	ACE inhibitor	1	ST	[66-67]	4,03