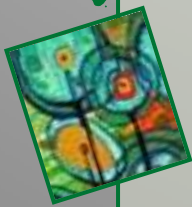




Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas

# Aplicación de fitoproteasas de *Maclura pomifera* en la liberación de péptidos bioactivos presentes en caseínas bovinas

Laboratorio de Procesos Biotecnológicos



Autora: María Alicia Corrons

Directora: Mariela A. Bruno

Año 2012

Laboratorio de Investigación  
de Proteínas Vegetales



Septiembre de 2012 - La Plata, Buenos Aires, Argentina

El presente trabajo para optar por el título de Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LiProVe), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, bajo la dirección de la Dra. Mariela A. Bruno.

...



# Agradecimientos

...

### Gracias...

A mi mamá, mi papá, mi hermana, mis abuelos y familia por acompañarme incondicionalmente durante todo este trayecto. Por sus palabras de afecto, contención y aliento.

A Mariela, mi directora, de quien aprendí tanto en estos años. A quien admiro por su iniciativa y amor por todo lo que hace. A quien agradezco profundamente por brindarme su cariño, paciencia, tiempo y confianza permitiéndome dar mis primeros pasos en la investigación. Por escucharme, aconsejarme y acompañarme siempre.

Al Dr. Néstor Oscar Caffini, quien me abrió amablemente las puertas de su laboratorio. Por su amabilidad, calidez y voluntad de trabajo de todos los días.

A Sebastián A. Trejo (IBB Barcelona) por el gran aporte de las espectrometrías de masas presentes en este trabajo.

A todos mis compañeros del Liprove por las charlas compartidas, la amistad y la ayuda que siempre me brindaron.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, sus profesores y docentes gracias a los cuales descubrí y aprendí tantas cosas.

A todos mis amigos y compañeros de la Facultad con quienes compartí horas y horas inolvidables de cursadas, estudio, charlas, nervios y alegrías.

A mis amigas y amigos platenses que me brindan tanto afecto. Por estar siempre, por otra etapa cumplida que transitamos...



## . Índice y Abreviaturas

... ..

# Índice

	Página
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1. Enzimas</b>	<b>2</b>
1.1. Generalidades	2
1.2. Proteasas	3
1.3. Proteasas en plantas	4
1.4. Aplicaciones industriales	5
1.5. Proteasas de <i>Maclura pomifera</i>	6
<b>2. Alimentos funcionales</b>	<b>7</b>
2.1. Generalidades	7
2.2. Péptidos bioactivos	9
<b>3. La Leche</b>	<b>10</b>
3.1. Características	10
3.2. Las caseínas	11
3.3. Coagulación de la leche	12
3.4. La leche como fuente de biopéptidos	13
<b>4. Estrés oxidativo</b>	<b>14</b>
4.1. Generalidades	14
4.2. Péptidos antioxidantes	15
<b>5. Hipertensión arterial</b>	<b>16</b>
5.1. Características de la enfermedad	16
5.2. El sistema renina-angiotensina-aldosterona	17
5.3. Péptidos antihipertensivos	18
<b>Objetivos</b>	<b>22</b>
Una perspectiva	23
Objetivos generales	24
Objetivos específicos	24
<b>Materiales y métodos</b>	<b>25</b>
<b>1. Obtención y caracterización de extractos con actividad proteolítica</b>	<b>26</b>
1.1. Material vegetal y obtención de extractos	26
1.2. Purificación parcial	26
1.3. Purificación cromatográfica	26

1.4. Contenido de proteínas	28
1.5. Actividad caseinolítica	28
1.6. Inactivación del PER por tratamiento térmico	29
1.7. SDS-PAGE	29
1.7.1. Preparación de muestras	29
1.7.2. Preparación de los geles	30
1.7.3. Aplicación de las muestras	31
1.7.4. Condiciones de corrida	31
1.7.5. Fijación, coloración y decoloración	31
1.7.6. Estimación de los PM	32
1.8. Isoelectroenfoque (IEF) y zimograma	32
1.8.1. Preparación de muestras	32
1.8.2. Preparación de los geles	33
1.8.3. Desarrollo del IEF	33
1.8.4. Fijación y coloración	33
1.8.5. Estimación de los pI	34
1.8.6. Zimograma	35
1.8.6.1. Preparación de las placas de agarosa embebidas en caseína	35
1.8.6.2. Incubación	35
1.8.6.3. Fijación y coloración	36
1.9. Uso de sustratos sintéticos y determinación de constantes cinéticas	36
<b>2. Coagulación de la leche</b>	37
2.1. Actividad coagulante de proteínas de la leche bovina	37
2.2. Preparación del lactosuero	38
<b>3. Hidrólisis controlada de caseínas</b>	38
<b>4. Caracterización de las muestras</b>	39
4.1. SDS-PAGE con tricina	39
4.1.1. Preparación de los geles	40
4.1.2. Aplicación de muestras y condiciones de corrida	40
4.1.3. Fijación y coloración	41
4.2. Determinación de la concentración de péptidos	41
4.3. Determinación del grado de hidrólisis	42
4.4. Análisis cromatográfico de los péptidos obtenidos	43
4.5. Espectrometría de masas	44
<b>5. Búsqueda de actividades biológicas en el lactosuero y en los hidrolizados de caseína</b>	45

5.1. Actividad antioxidante: técnica de reducción del DPPH	45
5.2. Actividad antioxidante: método de la inhibición de la decoloración del $\beta$ -caroteno	46
5.3. Determinación de la actividad inhibitoria de la ECA	47
<b>Resultados</b>	<b>49</b>
<b>1. Obtención y caracterización de extractos proteolíticos de <i>Maclura pomifera</i></b>	<b>50</b>
1.1. Preparación del EC y determinación de actividad	50
1.2. Efecto del tiempo de almacenamiento	51
1.3. Preparación de PER y determinación de actividad	51
1.4. Tratamiento térmico para la inactivación de la preparación enzimática	52
1.5. SDS-PAGE	53
1.6. IEF con zimograma	54
1.7. Purificación cromatográfica de una peptidasa	55
1.8. Ensayos de cinética enzimática	56
<b>2. Aplicaciones de los extractos proteolíticos sobre proteínas de leche</b>	<b>58</b>
2.1. Coagulación de la leche bovina	58
2.2. SDS-PAGE del lactosuero	61
2.3. Determinación de actividades en el suero	62
2.3.1. Actividad antioxidante	62
2.3.2. Actividad inhibitoria de la ECA	64
2.3.3. Elección de las caseínas para posteriores análisis	65
<b>3. Obtención y análisis de hidrolizados de caseínas</b>	<b>65</b>
3.1. Preparación de hidrolizados	65
3.1.1. Determinación de las condiciones de hidrólisis	65
3.1.2. Análisis por MALDI-TOF	66
3.2. Modificación de las condiciones de hidrólisis	68
3.2.1. Seguimiento por SDS-PAGE	68
3.2.2. Determinación del grado de hidrólisis y de la concentración peptídica	69
3.2.3. Verificación de la reproducibilidad en la obtención de hidrolizados	70
3.3. Análisis de los hidrolizados por RP- HPLC y espectrometría de masas	73
<b>4. Búsqueda de actividad antioxidante en los hidrolizados</b>	<b>75</b>
<b>5. Búsqueda e identificación de péptidos con actividad inhibitoria de la ECA</b>	<b>78</b>
5.1. Determinación del poder de inhibición de la ECA de los	78



hidrolizados	
5.2. Identificación de posibles péptidos responsables de la actividad inhibitoria de la ECA	79
5.3. Purificación de péptidos por HPLC	83
<b>Anexo</b>	<b>87</b>
Curvas de calibración	87
Listado de masas	91
<b>Conclusiones</b>	<b>92</b>
<b>Referencias</b>	<b>95</b>

## Abreviaturas

Abz: ácido o-aminobenzoico
Acril-Bis: mezcla de acrilamida y bisacrilamida
AD: agua destilada
B <sub>M</sub> : blanco de muestra
B <sub>R</sub> : blanco de reactivo
Da: daltons
DMSO: dimetil sulfóxido
Dnp: 2,4-dinitrofenil
DPPH: difenilpicrilhidracil
DS: desvío estándar
DTT: ditiotreitól
EC: extracto crudo
EC: Enzyme Commission
ECA: enzima convertidora de angiotensina I
EDTA: ácido etilendiaminotetra-acético

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer (transferencia de energía de fluorescencia por resonancia)

HCCA: ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico

IC<sub>50</sub>: concentración de muestra que logra un 50% de inhibición de la ECA

IEF: isoelectroenfoque

kDa: kilodaltons

K<sub>M</sub>: constante de Michaelis

M: muestra

MALDI-TOF: Matrix-assisted laser desorption ionization / time of flight (espectrometría de masas MALDI-TOF)

PER: precipitado etanólico redissuelto

PM: peso molecular

PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro

PSA: persulfato de amonio

RP-HPLC: cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa

SDS: dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: dodecil sulfato de sodio- electroforesis en gel de poliacrilamida

SRA: sistema renina-angiotensina-aldosterona

TCA: ácido tricloroacético

TEMED: N,N,N',N' - tetrametiletilendiamina

TFA: ácido trifluoroacético

TRIS: tri(hidroximetil)aminometano

U: unidad enzimática internacional

VC: volúmenes de columna

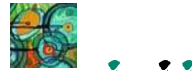
Ucas: unidad caseinolítica

U<sub>CBZ</sub>: unidad enzimática para sustratos de tipo N- $\alpha$ -CBZ-*p*-nitrofenil éster de aminoácidos

VF: volumen final

V<sub>máx</sub>: velocidad máxima

.. . Introducción



# 1. Enzimas

## 1.1. Generalidades

Los seres vivos utilizan la materia y la energía del ambiente mediante reacciones químicas que en conjunto se denominan metabolismo. Estas reacciones ocurren en condiciones fisiológicas y sus catalizadores son las enzimas. A excepción de un pequeño grupo de moléculas catalíticas de ARN, todas las enzimas son proteínas y su actividad depende del mantenimiento de la conformación nativa. Una enzima proporciona un microambiente específico dentro del cual una reacción dada puede ocurrir más rápidamente; este microambiente está situado dentro de los límites de una zona de la molécula de la enzima denominada sitio activo (Lehninger *et al.*, 2005).

Las enzimas poseen un poder catalítico extraordinario, mucho mayor que el de los catalizadores sintéticos o inorgánicos. Son altamente específicas, aceleran eficientemente las reacciones químicas que catalizan disminuyendo la energía de activación sin afectar las constantes de equilibrio y actúan en soluciones acuosas en condiciones muy suaves de temperatura y pH. Gracias a la configuración tridimensional de su sitio activo, unen ligandos específicos denominados sustratos y catalizan su conversión a productos en condiciones fisiológicas. En la célula las enzimas operan en secuencias organizadas, catalizando cientos de reacciones para degradar moléculas nutritivas, conservar y transformar la energía química y sintetizar macromoléculas biológicas a partir de precursores simples (Lodish *et al.*, 2004).

Existe un sistema de nomenclatura y clasificación de enzimas denominado EC ("Enzyme Commission", de la International Union of Biochemistry, 1961), en el cual a cada enzima se le asigna un número compuesto por 4 dígitos. El primero de los números corresponde a la clase a la que pertenece la enzima, dentro de la cual se distinguen 6 clases principales de acuerdo al tipo de reacción catalizada (Tabla 1). Los 3 números restantes corresponden a las subclases dentro de la clase principal, obteniendo así una clasificación progresivamente más específica.

nº	Clase	Tipo de reacción catalizada
1	Oxidoreductasas	Transferencia de electrones
2	Tranferasas	Reacciones de transferencia de grupos
3	Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis
4	Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de moléculas dando formas isoméricas
6	Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N mediante reacciones de condensación acopladas a la hidrólisis de ATP

**Tabla 1.** Clasificación internacional de enzimas.

## 1.2. Proteasas

Tradicionalmente se conocen con el nombre de proteasas a las enzimas que degradan proteínas. También son denominadas enzimas proteolíticas o péptido-hidrolasas. El Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB, 1984) recomendó el uso del término peptidasa como el más general para designar a las enzimas hidrolíticas que degradan enlaces peptídicos. El clivaje proteolítico de una unión peptídica es una de las más frecuentes e importantes modificaciones enzimáticas de proteínas en los sistemas vivos. El procesamiento proteolítico es la etapa final para la manifestación de actividad de una gran variedad de proteínas; esta etapa ocurre mediada por varias vías y con la participación de muchas peptidasas diferentes. La proteólisis es limitada y dirigida hacia la ruptura de uniones específicas en proteínas determinadas. Esta especificidad de corte depende, entre otros factores, de la accesibilidad de la unión peptídica a escindir, de los aminoácidos involucrados en este enlace y del entorno aportado por otros aminoácidos cercanos a la unión (Neurath, 1989).

En la actualidad se conocen más de mil peptidasas provenientes de vegetales, animales y microorganismos. Puede dividírselas en 2 grandes grupos: las endopeptidasas, que rompen uniones peptídicas en distintos puntos del interior de la proteína y las exopeptidasas, que remueven secuencialmente uno o más aminoácidos desde los

extremos carboxilo o amino. El término oligopeptidasa es a menudo empleado para referirse a endopeptidasas que actúan preferentemente sobre oligopéptidos (Barrett *et al.*, 2004a).

Las enzimas proteolíticas pueden ser también agrupadas en función del residuo aminoacídico que se encuentra en su sitio catalítico y participa en la catálisis. Se reconocen 5 tipos catalíticos diferentes: serínicos, treonínicos, cisteínicos, aspárticos y del tipo ion metálico (Barrett *et al.*, 2004b). A su vez, estos 5 tipos catalíticos de proteasas se pueden dividir en 2: aquellas que forman complejos covalentes entre la enzima y el sustrato (peptidasas serínicas, cisteínicas y treonínicas), donde el nucleófilo del sitio catalítico es parte de un aminoácido (serina, cisteína o treonina, respectivamente) y las que no forman complejos enzima-sustrato covalentes (peptidasas aspárticas y metalopeptidasas), siendo una molécula de agua activada la responsable del ataque nucleofílico. Estas categorías contribuyen al sistema EC, donde las peptidasas integran la subclase 3.4, que a su vez contiene 14 diferentes sub-subclases.

### 1.3. Proteasas en plantas

Las enzimas proteolíticas están implicadas en muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, cumpliendo un rol multifuncional que incluye la germinación, la senescencia, los ritmos circadianos y la muerte celular programada. Son necesarias para el recambio de proteínas, mecanismo fundamental por el cual proteínas dañadas, mal plegadas o potencialmente dañinas se constituyen en una fuente de aminoácidos para la síntesis de nuevos componentes proteicos (Caffini *et al.*, 2009). Las proteasas son, por otra parte, responsables de modificaciones postraduccionales produciendo clivajes en sitios muy específicos de la proteína blanco. De esta manera se produce la activación de proenzimas, el ensamblaje apropiado de proteínas y su direccionamiento hacia distintos compartimientos celulares; así como el control de la actividad de enzimas, proteínas reguladoras y péptidos (Schaller, 2004). Además, la proteólisis desempeña un papel clave en procesos biológicos como el reconocimiento de patógenos y la inducción de respuestas de defensa. Las proteasas forman parte de cascadas de señalización donde el

procesamiento proteolítico constituye un mecanismo ampliamente utilizado para la regulación de las respuestas defensivas de las plantas (Xia, 2004).

El análisis de los datos completos de alrededor de cien genomas de plantas ha demostrado que aproximadamente un 2% de todos los productos génicos son peptidasas, evidenciándose así que se trata de uno de los grupos funcionales de proteínas más grandes e importantes (Barrett *et al.*, 2004a). Sin embargo, las proteasas no se encuentran normalmente en cantidades muy elevadas y a menudo son difíciles de detectar. La presencia de concentraciones extremadamente altas de enzimas proteolíticas en algunos tejidos es una característica de ciertas familias (*Caricaceae*, *Bromeliaceae*, *Moraceae*), donde dichas peptidasas actuarían como “aleloquímicos”, en defensa contra agentes patógenos, parásitos y herbívoros (Konno *et al.*, 2004).

## 1.4. Aplicaciones industriales

Las enzimas del mercado actual tienen múltiples aplicaciones en el procesamiento de alimentos, en la producción de detergentes y limpiadores, en la industria textil, en el tratamiento de cueros y pieles, en la manufactura de pulpa de papel, entre otras. La menor contaminación producida y la amplitud de aplicaciones hacen que este mercado crezca con rapidez. La eficiencia del empleo de enzimas se refleja por ejemplo en el menor volumen y costo de las materias primas empleadas en la producción y en un menor número de productos secundarios no deseados (Nielsen & Olsen, 2002; Santibáñez Quezada, 2005).

Las enzimas empleadas en la producción de alimentos derivan tradicionalmente de microorganismos, plantas y animales. Actualmente se puede aumentar su valor agregado mediante la modificación genética de su estructura (mutagénesis sitio-dirigida), que consecuentemente hace variar su actividad y por otra parte se puede llevar a cabo la producción alternativa de enzimas en biorreactores o en plantas transgénicas. Estas son las llamadas enzimas de segunda y tercera generación (Santibáñez Quezada, 2005). En la industria alimenticia las enzimas se utilizan en la manufactura de pan, la elaboración de quesos y lácteos, el procesamiento de almidones y la producción de jugos de frutas, vino y

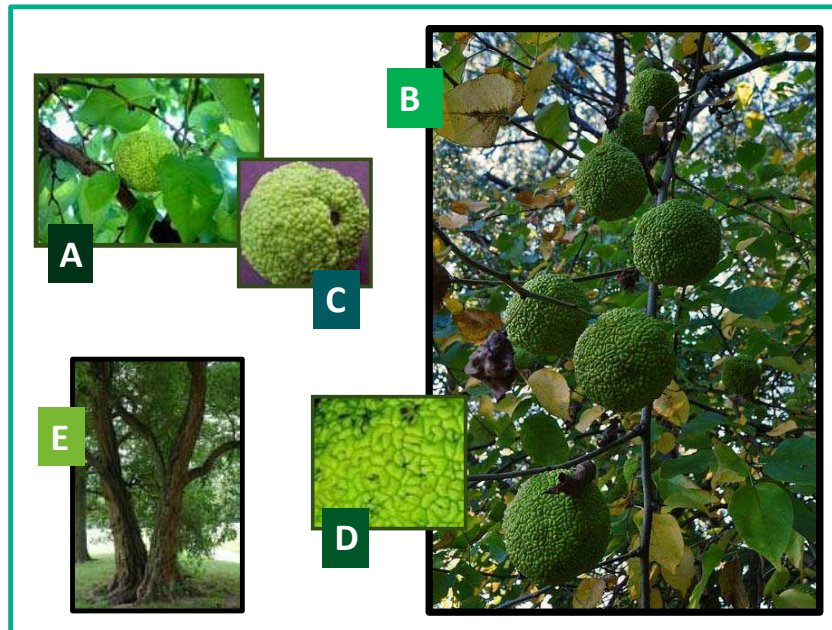
cerveza. Pueden también ser empleadas para mejorar la calidad de los alimentos, modificando su apariencia, textura, contenido nutricional, sabor y aroma (Vallés *et al.*, 2009).

### 1.5. Proteasas de *Maclura pomifera*

*Maclura pomifera* (Raf.) Schneid (*Moraceae*), (naranja de Osage o de Luisiana), es un árbol cultivado en toda la región templado-cálida de nuestro país, empleado para formar cercos vivos y rompevientos y también con fines ornamentales (López *et al.*, 1993). El árbol es dioico, de mediano tamaño, originario de América boreal y posee madera dura, resistente a la sequía y las termitas, pudiendo crecer en la mayoría de los tipos de suelo. El fruto es un sincarpio esférico, rugoso, verde-amarillento, de 10 a 15 cm de diámetro que exuda un látex pegajoso. Contiene algunos alcaloides, glicósidos, carbohidratos y flavonoides que han demostrado ser antimicrobianos (Altuner *et al.*, 2012).

El látex contenido en frutos maduros de *M. pomifera* contiene proteasas de elevada actividad denominadas “pomiferinas” que son activas sobre diversos sustratos proteicos. Estas fitoproteasas son de tipo serínico, no calcio-dependientes y presentan mayor actividad caseinolítica a pH alcalino, siendo el rango óptimo de 9,3 a 10,3 (López & Lazza, 2009). La Figura 1 muestra detalles del árbol de *M. pomifera* y sus frutos.





**Figura 1.** Imágenes de *M. pomifera*. A y B: frutos en el árbol. C: fruto recolectado. D: detalle de las rugosidades del fruto. E: Árbol.

## 2. Alimentos funcionales

### 2.1. Generalidades

Realizar una alimentación equilibrada es de fundamental importancia debido a la implicancia que tienen los nutrientes para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de las funciones del organismo. La idea de alimento funcional surge del conocimiento de que los alimentos y los componentes alimentarios pueden ejercer una influencia beneficiosa sobre la salud y la calidad de vida (Franck, 2002). Un alimento es considerado funcional si se demuestra que, además de su efecto nutritivo, influye beneficiosamente en una o más funciones del organismo de modo que mejora el estado de bienestar y salud o reduce el riesgo de enfermedad. Los alimentos funcionales deben seguir siendo alimentos, demostrando sus efectos en las cantidades en que normalmente se consumen en la dieta.

No son medicamentos ni tienen la forma de cápsulas o comprimidos, por lo que el término pertenece a la nutrición y no a la farmacología (Ashwell, 2002a; López, 2007).

El concepto de alimento funcional nació en la década del ochenta en Japón y posteriormente, en los años noventa, se creó en Europa un proyecto conocido como FUFOSSE (“Funcional Food Science in Europe”). Así, se elaboró un marco global que incluyó una estrategia para la identificación y desarrollo de los alimentos funcionales y para la fundamentación científica de sus efectos, a fin de justificar las alegaciones que hablaban de mejora de la función corporal y de disminución del riesgo de enfermedad. Estos alimentos constituyen un desafío científico que estimula la investigación en nutrición para validar el desarrollo de nuevos alimentos y componentes alimentarios (Ashwell, 2002a). Dicho desarrollo se ve impulsado por el creciente conocimiento de los efectos genómicos y metabólicos que algunos componentes específicos de la dieta ejercen sobre los individuos, dando lugar a oportunidades para formular productos alimentarios que puedan mejorar la nutrición y la salud en una sociedad en la cual las enfermedades asociadas al estilo de vida y el envejecimiento son consideradas una amenaza para el bienestar (Korhonen, 2009a).

Por otro lado, debe tenerse en cuenta que los componentes de alimentos tienen un efecto crónico más que agudo sobre la salud. Es por esto que han de desarrollarse métodos que puedan medir los efectos a largo plazo en humanos. Para este fin habrá que identificar los biomarcadores adecuados que resulten representativos del efecto beneficioso alegado (Hartmann & Meisel, 2007).

En la práctica existen varias maneras de generar un alimento funcional. Puede ser un alimento natural en el que uno de sus componentes ha sido mejorado mediante condiciones especiales de cultivo o un alimento al que se le ha añadido un componente para que produzca beneficios, como es el caso de las bacterias probióticas que mejoran la salud intestinal. También se puede pensar en la eliminación o la reducción de componentes con efectos adversos o en el aumento de la biodisponibilidad de un componente para mejorar su asimilación. Por último, es posible modificar químicamente la naturaleza de algún componente de un alimento para que otorgue un beneficio

adicional: este es el caso de la obtención de hidrolizados proteicos (Hartmann & Meisel, 2007).

## 2.2. Péptidos bioactivos

El consumo de proteínas en la dieta es de vital importancia por ser éstas la principal fuente de aminoácidos. Además, las proteínas poseen otras funcionalidades *in vivo* debido a que en sus secuencias pueden hallarse encriptados ciertos péptidos capaces de ejercer actividades biológicas (Korhonen, 2009a). Bajo el término de péptidos bioactivos se engloba a aquellos péptidos que tienen funciones regulatorias benéficas, más allá de su valor nutricional (Hartmann & Meisel, 2007). La actividad de estos péptidos (compuestos generalmente por 2 a 15 aminoácidos, Pihlanto-Lepälä, 2001) se basa en la secuencia específica de las cadenas peptídicas ejerciendo un efecto positivo sobre distintas funciones corporales. Así, las proteínas y péptidos presentes en los alimentos pueden resultar fisiológicamente activos *per se* o luego de ser liberados de su respectiva proteína madre por medio de una hidrólisis *in vitro* o *in vivo*. Para la liberación de biopéptidos existen básicamente 3 mecanismos: la acción del sistema gastrointestinal sobre la proteína, la fermentación del producto proteico usando cultivos de microorganismos o la hidrólisis enzimática de las proteínas con enzimas proteolíticas. En estudios recientes se han obtenido por semisíntesis péptidos modificados, diseñados a partir de péptidos naturales, con el fin de incrementar su actividad (Korhonen & Pihlanto, 2006).

En detalle, la acción del sistema gastrointestinal sobre las proteínas comprende: la digestión que comienza en el estómago y continúa en el lumen del intestino delgado, resultando en una mezcla de oligopéptidos y aminoácidos libres. El proceso continúa en el borde en cepillo de la superficie de las células del epitelio intestinal por la acción de distintas peptidasas, que forman tripéptidos, dipéptidos y aminoácidos libres. Finalmente, existen varias formas posibles para la absorción de los péptidos a través de la mucosa intestinal: el transporte activo mediado por transportador, el transporte transcelular por difusión pasiva o mediado por vesículas y la vía paracelular. Esta última opción es la que siguen la mayoría de los oligopéptidos, que quedan intactos. La forma de transporte se

relacionaría con el tamaño, carga, peso molecular, hidrofobicidad y puentes de hidrógeno presentes en los péptidos (Phelan *et al.*, 2009). Así, los biopéptidos pueden ejercer su acción tanto a nivel local en el tracto gastrointestinal, como a nivel sistémico, luego de atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos a través de la circulación sanguínea (Martínez Augustin & Martínez de Victoria Muñoz, 2006).

Se han descubierto muchas proteínas que contienen péptidos con potenciales actividades biológicas en soja, trigo, leche, huevos, carnes y pescados. Una amplia variedad de actividades biológicas han sido descritas, entre las que se incluyen: antimicrobiana, antihipertensiva (inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina: ECA), hipocolesterolémica, antitrombótica, antioxidante, promotora de la absorción o biodisponibilidad de minerales, citomoduladora o inmunomoduladora y opioide. Algunos péptidos son multifuncionales y pueden ejercer más de uno de estos efectos (Korhonen & Pihlanto, 2006).

La investigación sobre péptidos bioactivos se ha intensificado en los últimos 20 años y su potencial contribución para una nutrición más sana es ampliamente discutida en la comunidad científica. Se han desarrollado métodos químicos y biológicos para su identificación, aunque sólo algunos de los efectos beneficiosos que se les atribuyen han sido testeados en humanos. En la actualidad existen en Japón, Estados Unidos y Europa varios productos en el mercado que contienen péptidos bioactivos. (Hartmann & Meisel, 2007).

## 3. La leche

### 3.1. Características

La leche es producida por los mamíferos para otorgar a los neonatos no sólo los requerimientos nutricionales, sino también algunos beneficios fisiológicos y defensivos

atribuidos a sus microcomponentes: oligosacáridos, proteínas capaces de unir metales, inmunoglobulinas y enzimas. La leche contiene 30-35 g/l de proteína total de alta calidad nutritiva. La glándula mamaria sintetiza 6 productos proteicos de carácter mayoritario:  $\alpha_{s1}$ -caseínas,  $\alpha_{s2}$ -caseínas,  $\beta$ -caseínas,  $\kappa$ -caseínas,  $\alpha$ -lactoglobulinas y  $\beta$ -lactoalbúminas, que exhiben polimorfismo genético. Las caseínas representan el 80% de la proteína total mientras que el 20% restante lo conforman las proteínas del lactosuero ( $\alpha$ -lactoglobulinas y  $\beta$ -lactoalbúminas). Así, la leche resulta una solución acuosa de lactosa, sales orgánicas e inorgánicas y numerosos componentes traza en la que están dispersas partículas coloidales de 3 rangos de tamaño: las proteínas del suero disueltas a nivel molecular, las caseínas dispersas como agregados coloidales llamados micelas (50-500 nm), y los lípidos emulsificados como glóbulos (1-20  $\mu$ m). El pH de la leche recién obtenida es de 6,6-6,7. Su estabilidad coloidal, especialmente de las micelas de caseínas es muy importante desde los puntos de vista nutricional y tecnológico. Las micelas pueden desestabilizarse y agregarse luego de una proteólisis o una acidificación hasta pH 4,6. *In vivo*, esta agregación ocurre en el estómago, mejorando la digestibilidad. Tecnológicamente la desestabilización de las micelas es utilizada para la producción de quesos y productos fermentados (Fox, 2009).

### 3.2. Las caseínas

Las caseínas son conocidas por sus propiedades nutricionales debido a su contenido de aminoácidos valiosos además de calcio, fosfato y varios elementos traza. La micela de caseína posee forma esférica y está compuesta por las 4 fracciones ya mencionadas, compuestos inorgánicos y ácido cítrico (Tabla 2). En la composición de cada caseína se encuentran presentes residuos de fosfoserina y un relativamente alto contenido de prolina. Las  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  y  $\beta$ -caseínas poseen una región donde se localizan las fosfoserinas y precipitan con el agregado de calcio, mientras que la  $\kappa$ -caseína, que tiene sólo una fosfoserina, no lo hace (Akuzawa *et al.*, 2009).

Los diferentes modelos propuestos para explicar la estructura de las micelas consideran que la  $\kappa$ -caseína determina su estabilidad. El extremo N-terminal hidrofóbico

interacciona con el interior insoluble, mientras que el extremo C-terminal con carga negativa queda en contacto con el medio acuoso (Vasbinder *et al.*, 2003).

Componente	Contenido (g/100g de micela)
<b>Caseína</b>	93,3
$\alpha_{S1}$ -caseína	35,6
$\alpha_{S2}$ -caseína	9,9
$\beta$ -caseína	35,9
$\kappa$ -caseína	11,9
<b>Minerales</b>	6,24
Calcio	2,87
Magnesio	0,11
Sodio	0,11
Potasio	0,26
Fosfato inorgánico	2,89
Citrato	0,4

**Tabla 2.** Composición de las micelas de caseína de la leche bovina (Akuzawa *et al.*, 2009).

### 3.3. Coagulación de la leche

La quimosina es el principal componente del cuajo del ternero y ha sido tradicionalmente usada en la manufactura de quesos debido a su alta especificidad por la  $\kappa$ -caseína y su poca actividad proteolítica general (Pires *et al.*, 1994; Vishwanatha *et al.*, 2010). La coagulación de la leche involucra un primer paso en que se produce la hidrólisis limitada de la  $\kappa$ -caseína y consecuentemente el depilado de las micelas. Este proceso se debe al clivaje de la unión Phe105-Met106 que provoca la separación de los 2 dominios de la  $\kappa$ -caseína resultando en un péptido hidrofílico glicosilado llamado glicomacropéptido y un péptido hidrofóbico, la para-  $\kappa$ -caseína (Starovoitova *et al.*, 2005). Se favorece la agregación y en un paso posterior las caseínas se entrelazan en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  formando un gel. Numerosos factores influyen en la coagulación y en las propiedades reológicas del gel, siendo los más importantes la concentración de caseínas y de  $\text{Ca}^{+2}$ , el pH, el tratamiento térmico previo de la leche y la temperatura de coagulación (Jovanović, *et al.* 2002). Para considerar a una enzima como coagulante de la leche, es necesario que

la relación coagulación/proteólisis sea comparable con la de la quimosina, debiendo presentar alta actividad coagulante y baja actividad proteolítica (Fox & Stepaniak, 1993).

Existen varias fitopeptidasas capaces de coagular la leche y algunas han sido empleadas tradicionalmente en la península Ibérica en la elaboración de quesos. En los últimos años, la búsqueda de nuevos coagulantes de la leche de origen vegetal se ha intensificado (Chazarra *et al.*, 2007; Tubesha & Al-Delaimy, 2003). Por ejemplo, los extractos florales de *Cynara cardunculus* poseen 2 proteasas aspárticas (A y B cardosinas) con actividad y especificidad similar a la quimosina y la pepsina, respectivamente (Veríssimo *et al.*, 1995). En estudios posteriores se vio que la cardosina A puede, además de clivar la unión Phe105-Met106 de la  $\kappa$ -caseína hidrolizar otros enlaces en otras caseínas (Silva & Malcata, 2005a). Recientemente se ha reportado la habilidad de algunas proteasas serénicas de plantas como coagulantes de la leche (Kumari *et al.*, 2010; Singh & Dubey, 2011).

Por otro lado, debe considerarse que la industria quesera produce grandes cantidades de suero como producto secundario, que contiene el 18% del total de las proteínas de la leche (Smithers, 2008). Como los costos para degradarlo resultan altos y con el fin de utilizar las proteínas de alto valor nutricional que contiene, se ha incrementado la búsqueda de aplicaciones para el aprovechamiento comercial del suero como componente de alimentos (Macdermid & Stannard, 2006; Marshall, 2004).

### 3.4. La leche como fuente de biopéptidos

Los péptidos bioactivos provenientes de la leche, son apropiados para formar parte de alimentos funcionales que favorecerían el funcionamiento de los sistemas cardiovascular, digestivo, nervioso, óseo e inmunológico. Podrían incluso ser benéficos para reducir el riesgo de obesidad y de diabetes tipo II. (Korhonen, 2009b; Phelan *et al.*, 2009). Hay básicamente 2 formas de producir péptidos biológicamente activos a partir de las proteínas de la leche: la fermentación con cultivos starter proteolíticos o la producción de hidrolizados con enzimas proteolíticas (Korhonen, 2009a). Estos últimos han sido

utilizados también para otros propósitos, tales como mejorar o modificar las propiedades funcionales de ciertos alimentos o reducir la alergenicidad de las proteínas.

Los péptidos bioactivos derivados de las caseínas se encuentran en zonas estratégicas que resultan parcialmente protegidas de posteriores rupturas hidrolíticas. Hasta ahora, la liberación de los péptidos bioactivos derivados de la leche se ha demostrado *in vitro* y menormente *in vivo* empleando modelos animales. Sin embargo la verificación experimental de su efectividad en humanos sigue siendo muy escasa (Silva & Malcata, 2005b). Por otra parte, diferentes péptidos bioactivos se encuentran también encriptados en las proteínas del lactosuero. Los biopéptidos, pueden ser liberados en el proceso de coagulación de la leche gracias al comportamiento hidrolítico de la peptidasa coagulante que se emplee (Korhonen, 2009b).

## 4. Estrés oxidativo

### 4.1. Generalidades

El oxígeno es esencial para la vida humana pero también interviene en reacciones tóxicas que resultan ser una amenaza para el bienestar del organismo. Las especies reactivas de oxígeno actúan como oxidantes y pueden causar daño a las moléculas biológicas. La producción y actividad prolongada de estas especies contribuye al daño severo de los tejidos (Erdmann *et al.*, 2008) y son probablemente las principales causantes del envejecimiento y de muchas enfermedades asociadas a éste; entre las que se pueden citar la enfermedad cardiovascular, el cáncer, las cataratas, el declive del sistema inmunitario relacionado con la edad y las enfermedades degenerativas del sistema nervioso (de Parkinson y de Alzheimer).

El organismo humano posee varios mecanismos de defensa contra las especies reactivas del oxígeno que se complementan mutuamente porque actúan sobre distintos



oxidantes o en diferentes compartimientos celulares. Una importante línea de defensa consiste en el sistema de enzimas antioxidantes. La nutrición desempeña un papel clave en el mantenimiento de estas defensas enzimáticas ya que varios minerales esenciales y oligoelementos intervienen en la estructura o la actividad catalítica de estas enzimas. Por esta razón, el suministro de estos elementos debe ser el adecuado. Una segunda línea de defensa consiste en un grupo de compuestos de bajo peso molecular que pueden regenerar la capacidad amortiguadora de los sistemas antioxidantes del organismo. Muchos de estos componentes se encuentran presentes en los alimentos y son de origen vegetal. Los más conocidos son las vitaminas E y C, los carotenoides y los polifenoles, incluidos los flavonoides. Si la exposición a fuentes externas de oxidantes es intensa, las defensas antioxidantes del organismo pueden resultar insuficientes. Esto origina estrés oxidativo, es decir, una ruptura del equilibrio entre las sustancias prooxidantes y los mecanismos antioxidantes (Ashwell, 2002b).

## 4.2. Péptidos antioxidantes

Estudios recientes muestran que péptidos con propiedades antioxidantes pueden ser liberados de proteínas de alimentos como huevo, soja y leche (Erdmann *et al.*, 2008). Por ejemplo, la hidrólisis de caseínas con enzimas digestivas o la fermentación de la leche con cepas de bacterias ácido-lácticas pueden liberar péptidos antioxidantes. La mayoría de los péptidos identificados derivan de la  $\alpha$ -caseína, tienen secuencias específicas con alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos y poseen la capacidad de eliminar radicales libres además de impedir la peroxidación enzimática (mediado por lipooxigenasa) y no enzimática de lípidos y ácidos grasos esenciales (Korhonen & Pihlanto, 2006). Los mecanismos involucrados en la actividad antioxidante de los péptidos incluyen la participación en la eliminación de radicales libres y oxígeno singlete, la capacidad de quelación de iones metálicos y la inducción de genes que protegen la célula de las especies reactivas de oxígeno. La investigación de péptidos sintéticos conteniendo histidina demostró que la acción antioxidante es más bien atribuible al efecto cooperativo de estos diferentes mecanismos. Los péptidos con una secuencia Pro-His-His han

mostrado la mayor actividad antioxidante produciendo además un efecto sinérgico con los antioxidantes no peptídicos (Phelan *et al.*, 2009; Erdmann *et al.*, 2008).

Se ha reportado que mientras que la caseína es capaz de inhibir la autooxidación de lípidos mediada por lipooxigenasa, los aminoácidos libres no ejercen el mismo efecto antioxidante. Esto sugiere que tanto la unión peptídica como las características estructurales específicas de los péptidos juegan un rol crucial, pudiendo intensificar o antagonizar la capacidad antioxidante. En este sentido, se requiere más investigación sobre la relación estructura-actividad de estos péptidos (Erdmann *et al.*, 2008, Phelan *et al.*, 2009).

En vista de lo expuesto, algunos péptidos derivados de la leche podrían tener potenciales aplicaciones como ingredientes de alimentos funcionales, ya que por un lado la inhibición de los procesos de oxidación es de particular importancia para la vida de las células del organismo y por otro lado, estos péptidos bioactivos también actuarían en la prevención de la oxidación de las grasas que contienen los alimentos (Korhonen & Pihlanto, 2006).

## 5. Hipertensión arterial

### 5.1. Características de la enfermedad

Las enfermedades cardiovasculares son un grupo de enfermedades degenerativas, que incluyen la cardiopatía isquémica, la enfermedad de las arterias periféricas y el accidente cerebrovascular. Los intentos por prevenir estas enfermedades se basan por lo general en la modificación o mejora de los factores de riesgo responsables de la presión arterial elevada, la obesidad, la resistencia a la insulina o la presencia de un perfil lipídico desfavorable. La hipertensión arterial es la elevación patológica de la presión que ejerce la sangre bombeada por el corazón sobre los vasos sanguíneos. Reducir la presión debería

disminuir la probabilidad de enfermedad coronaria, porque una presión sanguínea elevada aumenta el riesgo de lesión arterial (Ashwell, 2002b).

## 5.2. El sistema renina-angiotensina-aldosterona

La presión arterial es controlada por varias rutas bioquímicas que interactúan entre sí. El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA) es una de las vías centrales de la regulación y la patogénesis de la hipertensión está estrechamente asociada con desórdenes en dicho sistema. El SRA estimula la activación simpática de secreción de renina por las células yuxtglomerulares, siendo el riñón la principal fuente de renina activa en la circulación. El angiotensinógeno (Ao) es una glicoproteína que se produce en el hígado y es el sustrato inicial del SRA. La renina es la enzima que reacciona con el Ao circulante, dando lugar a un decapeptido, la angiotensina-I (Ang-I). La enzima convertidora de Angiotensina (ECA) es una dipeptidil carboxipeptidasa I, zinc metalopeptidasa, sintetizada en el pulmón. Esta enzima cliva el dipéptido del extremo C-terminal de la Ang-I convirtiéndola en angiotensina-II (Ang-II) la cual es el componente activo principal del sistema: inhibe al péptido vasodilatador bradikinina y también causa la expansión de volumen a través de la retención de sodio (vía aldosterona y vasoconstricción renal) y la retención de fluidos (vía hormona antidiurética). La Ang-II es un potente vasoconstrictor, ya que actúa directamente sobre las células del músculo liso vascular y sobre el sistema nervioso simpático, tanto periféricamente como centralmente para incrementar el tono vascular (Torruco-Uco *et al.*, 2008). La Figura 2 muestra un esquema del funcionamiento del SRA.

La hipertensión arterial ha sido tratada con diversos medicamentos sintéticos. Entre los más comunes se encuentran los inhibidores de la ECA, los  $\beta$ -bloqueadores, los diuréticos y los bloqueadores de los receptores de angiotensina-II, los cuales han sido eficaces y bien tolerados en el tratamiento de esta enfermedad. Sin embargo estos medicamentos de origen sintético, además de ser de costo elevado, pueden producir ciertas alteraciones secundarias a corto y largo plazo, como la tos, perturbación en el sabor y salpullidos en la piel, entre otros. La posibilidad de bloquear el SRA, resulta

entonces de importancia clínica (Torruco-Uco *et al.*, 2008). A los tratamientos preventivos y terapéuticos, se han sumado en los últimos años intentos para identificar los componentes dietarios que podrían contribuir a la salud cardiovascular.

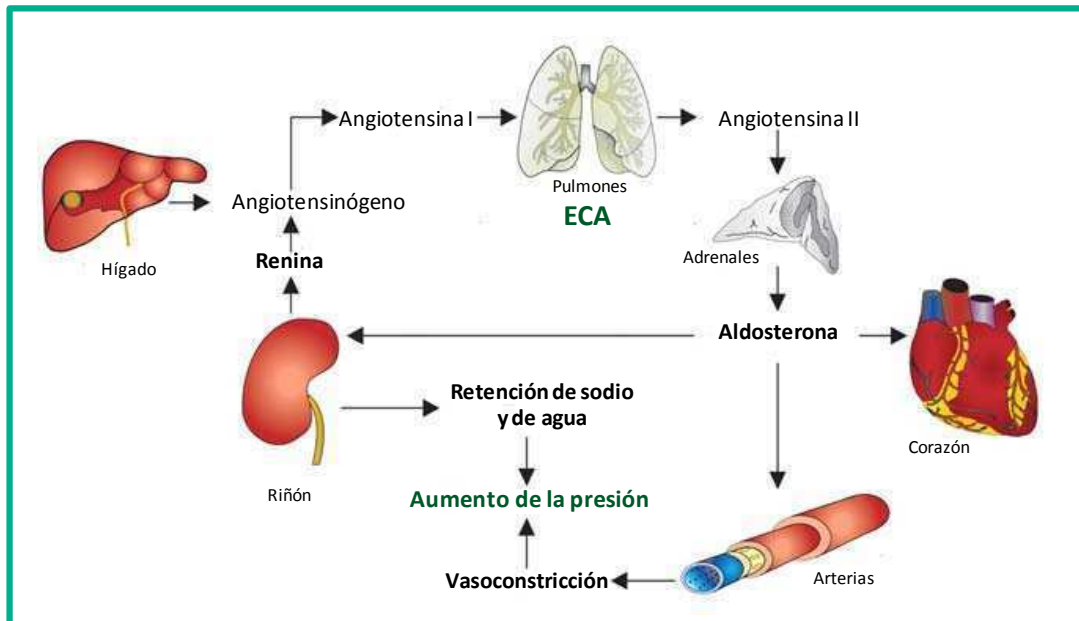


Figura 2. Esquema simplificado del funcionamiento del SRA.

### 5.3. Péptidos antihipertensivos

Un gran número de péptidos bioactivos inhibidores de la ECA han sido aislados de la digestión de proteínas de leche, pescado y carne. Son generalmente péptidos de entre 2 y 10 residuos que contienen aminoácidos polares como prolina. El valor de  $IC_{50}$  (concentración de inhibidor con que se alcanza un 50% de inhibición) es usado para estimar la efectividad de los diferentes péptidos inhibidores de la ECA. Debe tenerse en cuenta que esto no está siempre estrechamente ligado al efecto hipotensor *in vivo*, ya que algunos péptidos son susceptibles de degradación o modificación en el estómago, el hígado o el sistema vascular. En contraste, la actividad inhibitoria de la ECA de péptidos de larga cadena puede ser causada por el efecto de las enzimas gastrointestinales (Hartmann & Meisel, 2007).

En el caso particular de las proteínas de la leche, varios estudios han puesto de manifiesto que diferentes hidrolizados proteicos o productos obtenidos por fermentación, contienen péptidos inhibidores de la ECA capaces de disminuir la presión arterial en humanos. Estos biopéptidos provienen de las  $\alpha$ -,  $\beta$ - o  $\kappa$ -caseínas, la  $\beta$ -lactoglobulina, la  $\alpha$ -lactalbúmina y la seroalbúmina. La formación de péptidos bioactivos derivados del suero y las caseínas durante la fermentación se observa con diferentes starters comerciales empleados para producir yogur, leche ácida o quesos. La actividad inhibitoria de la ECA prácticamente no se detecta en aquellos productos donde el grado de proteólisis es bajo (yogur, queso fresco o ricotta) pero va en aumento a medida que se deja madurar el queso. Otros estudios demostraron que la posterior digestión de las muestras con pepsina y tripsina produce un gran aumento de la actividad inhibitoria de la ECA, ya que se liberan varios nuevos péptidos de las  $\alpha_{S1}$ - y  $\beta$ -caseínas (Korhonen & Pihlanto, 2006). Por otro lado, se han descrito numerosos ensayos de hidrólisis de proteínas lácteas con enzimas digestivas (pepsina, tripsina y quimotripsina) donde se liberan péptidos antihipertensivos, tanto de las diferentes caseínas como de las proteínas del suero ( $\alpha$ -lactalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina y glicomacropéptido). Se ha demostrado que es en los hidrolizados de caseínas donde se obtienen mayores niveles de inhibición de la ECA (Korhonen, 2009a).

En cuanto a los estudios *in vivo*, existen varios ensayos con péptidos antihipertensivos realizados en ratas y también en humanos hipertensos. Se ha demostrado que los péptidos son capaces de reducir notoriamente la presión arterial vía administración oral o intravenosa. Resulta de importancia el hecho de que los péptidos estudiados tuvieron muy poco o nulo efecto sobre la presión de individuos normotensos, indicando que no pueden generar un efecto hipotensor agudo. De esta manera, los péptidos inhibidores de la ECA pueden ser utilizados como tratamiento inicial para personas con problemas de hipertensión (Erdmann *et al.*, 2008).

Para el caso particular de los péptidos derivados de la leche identificados como antihipertensivos *in vitro*, aún resta investigar la acción de muchos de ellos *in vivo* (Korhonen, 2009b). La mayoría de estos péptidos poseen *in vitro* una moderada capacidad inhibitoria de la ECA (rango de  $IC_{50}$  entre 100-500  $\mu\text{mol/L}$ ), pero el efecto *in vivo* es difícil

de pronosticar porque, como ya se dijo, en el organismo los péptidos deben absorberse en el intestino y llegar activos al sistema cardiovascular. Sin embargo, estudios comparativos con captopril, mostraron que los péptidos que inhiben la ECA tienen mayor actividad *in vivo* que *in vitro*. Aparentemente los biopéptidos poseen mayor afinidad por los tejidos y se eliminan más lentamente que el captopril. También se postula que estos péptidos podrían actuar provocando la liberación de sustancias vasodilatadoras como la prostaglandina I<sub>2</sub>, NO o CO. Por último, algunas particularidades estructurales parecen ser muy importantes en el efecto producido. Se observó que los péptidos que contienen prolina en el extremo C-terminal son generalmente resistentes a la degradación por enzimas digestivas y que la bioactividad de los péptidos parece decaer a medida que aumenta su tamaño. La unión a la ECA se relacionaría con la secuencia C-terminal, que influiría en el tiempo de duración del efecto hipotensor y donde la prolina, lisina o arginina tendrían mayor capacidad de inhibición (Erdmann *et al.*, 2008).

En síntesis, la mayoría de los estudios realizados hasta el momento en humanos muestran una moderada o significativa reducción de la presión luego del consumo de hidrolizados específicos de proteínas lácteas o leches fermentadas (Korhonen, 2009a). Así, actualmente se comercializan alimentos hipotensores como *Ameal S™* (Calpis, Japón) y *Evolus®* (Valio, Finlandia) que contienen una mezcla de los tripéptidos Val-Pro-Pro y Ile-Pro-Pro procedentes de las caseínas de la leche fermentada con *Lactobacillus helveticus*. Cabe recalcar que si bien los péptidos inhibidores de la ECA derivados de productos lácteos no llegan a ser tan potentes como las drogas comúnmente usadas para el tratamiento de la hipertensión, tienen la ventaja de ser intrínseca y naturalmente bioactivos, por lo que pueden introducirse fácilmente como parte de la alimentación diaria. También es cierto que al incorporar estos péptidos en la formulación de alimentos funcionales deben considerarse posibles efectos adversos, sobre todo si se agregan en concentraciones mucho más elevadas que la correspondiente al alimento lácteo original (Silva & Malcata, 2005b). La Tabla 3 muestra ejemplos de algunos péptidos inhibitorios de la ECA y/o con demostrada actividad antihipertensiva obtenidos a partir de proteínas lácteas.

Secuencia	Origen	Enzima	Actividad demostrada
VPP, IPP	$\beta$ -caseína	Proteinasa de <i>Lactobacillus helveticus</i>	IECA/Antihipertensiva
VYP, VYPFPG	$\beta$ -caseína	Proteinasa K	Antihipertensiva
KVLPVP, KVLPVPQ	$\beta$ -caseína	Proteinasa de <i>Lactobacillus helveticus</i>	Antihipertensiva
LHLPLP	$\beta$ -caseína	Proteinasa de <i>Enterococcus faecalis</i>	IECA/Antihipertensiva
FFVAPFPEVFGK	$\alpha_{s1}$ -caseína	Tripsina	IECA/Antihipertensiva
ALPMPHIR	$\beta$ -lactoglobulina	Tripsina	IECA/Antihipertensiva
LLF, LKQW	$\beta$ -lactoglobulina	Termolisina	IECA/Antihipertensiva
IPA	$\beta$ -lactoglobulina	Varias enzimas	IECA/Antihipertensiva
YGLF	$\alpha$ -lactoglobulina	Varias enzimas	Antihipertensiva

**Tabla 3.** Péptidos derivados de la leche con actividad antihipertensiva.

IECA: Actividad inhibitoria de la ECA (Aleixandre *et al.*, 2008).

...

## Objetivos





## Una perspectiva...

Los potenciales beneficios para la salud de los péptidos derivados de la leche resultan de alto interés comercial. Como lo demuestran los estudios en hidrolizados de caseínas, las proteínas lácteas son hasta el momento las mejores precursoras de péptidos bioactivos. Aún son pocos los productos que han sido lanzados al mercado y la tendencia parece continuar hacia el desarrollo de nuevos alimentos conteniendo péptidos capaces de tratar variados problemas de salud (Akuzawa *et al.*, 2009; Phelan *et al.*, 2009).

En la producción de alimentos funcionales conteniendo biopéptidos, es necesario lograr un aumento en su biodisponibilidad a partir de la fuente natural; o bien debe crearse una nueva fórmula por adición y/o fortificación con fracciones aisladas o enriquecidas en dichos péptidos bioactivos (Phelan *et al.*, 2009). En este sentido, la biodisponibilidad y la seguridad son aspectos sobre los cuales debería profundizarse la investigación. La estabilidad de las estructuras químicas, la actividad biológica de los péptidos de interés en diferentes matrices y su subsecuente destino durante el proceso de digestión no pueden dejarse de lado a la hora de desarrollar la fórmula de un nuevo producto alimenticio. Además, estudios moleculares serán necesarios para descifrar los mecanismos específicos por los cuales los péptidos bioactivos ejercen su actividad. Para ello emergen nuevas tecnologías como técnicas nutrigenómicas, que estudian el impacto de las proteínas y péptidos en la expresión de genes (Korhonen & Pihlanto, 2007). La producción comercial de secuencias peptídicas específicas se encamina probablemente hacia el empleo de enzimas y cepas recombinantes, o alternativamente a la utilización de peptidasas aisladas de organismos adecuados (Korhonen & Pihlanto, 2006).

Hoy en día, las estrategias que se utilizan para identificar y caracterizar péptidos bioactivos incluyen el aislamiento a partir de hidrolizados *in vitro* de las proteínas precursoras con diferentes enzimas; el aislamiento a partir de productos fermentados y la síntesis química de péptidos con estructura idéntica a aquella que se presume que posee alguna actividad. Una vez identificados, estos péptidos pueden ser ensayados primero en

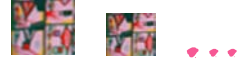
cultivo celular, subsecuentemente en modelos animales y por último en humanos para determinar sus efectos biológicos (Phelan *et al.*, 2009).

## Objetivos generales

Es posible que las proteasas presentes en *Maclura pomifera* sean capaces de escindir en forma específica enlaces peptídicos de proteínas alimentarias como las caseínas, provocando no sólo la coagulación de la leche con la posibilidad de elaborar quesos, sino también la liberación de péptidos bioactivos. El presente trabajo tiene como objetivo la preparación de hidrolizados de caseínas empleando extractos obtenidos a partir de frutos de *Maclura pomifera* y a continuación la búsqueda y aislamiento de péptidos con potencial actividad biológica *in vitro*.

## Objetivos específicos

1. Obtención, purificación y caracterización de extractos proteolíticamente activos obtenidos a partir de látex de *Maclura pomifera*.
2. Hidrólisis de sustratos sintéticos y determinación de constantes cinéticas.
3. Determinación de la actividad coagulante de la leche bovina.
4. Obtención de hidrolizados de caseína y caracterización del perfil peptídico.
5. Búsqueda de actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) y de actividad antioxidante en los hidrolizados.
6. Aislamiento e identificación *in silico* de los péptidos bioactivos responsables de las actividades biológicas detectadas.



# ... Materiales y Métodos

# 1. Obtención y caracterización de extractos con actividad proteolítica

## 1.1. Material vegetal y obtención de extractos

Se recogieron frutos de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid (*Moraceae*) en la ciudad de La Plata en los meses de marzo-abril de 2010, 2011 y 2012. En cada caso, se les extrajo el látex por exudación, realizando incisiones en los frutos y colectando a temperatura de 0-4 °C sobre 50 ml de buffer fosfatos de pH 6,6 conteniendo EDTA 5 mM, completándose hasta un volumen final de 80 ml con agua destilada (AD). Posteriormente se realizó una clarificación por centrifugación a 4 °C durante 30 min a 16000 g. Se descartó el pellet y el supernadante y se colectó el líquido transparente. A esta preparación se la denominó extracto crudo (EC) y fue posteriormente fraccionada y almacenada a -20 °C.

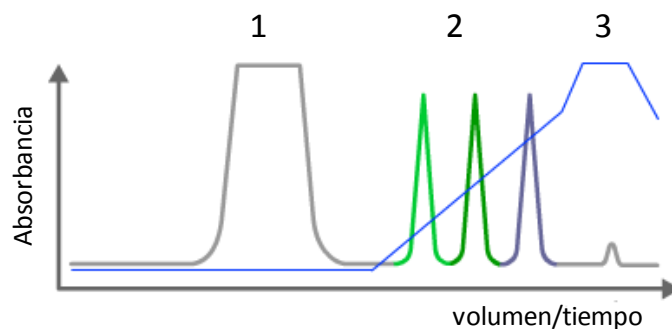
## 1.2. Purificación parcial

El EC se purificó en forma preliminar por precipitación etanólica fraccionada. Para ello, se colocó 1 volumen de EC más 1 volumen de etanol a -20 °C. Se incubó en freezer a -20 °C durante 30 min y luego se centrifugó otros 30 min a 16000 g y 4 °C, descartándose el sobrenadante. Posteriormente, se evaporaron los restos de etanol empleando una bomba de vacío. Se añadió, en baño de hielo, un volumen de buffer fosfato 0,1 M (pH 6,6, EDTA 5 mM) de manera de obtener el mismo volumen de partida. A esta preparación se la denominó precipitado etanólico redissuelto (PER).

## 1.3. Purificación cromatográfica

Se empleó la técnica de cromatografía de intercambio catiónico para separar las distintas fracciones proteicas del PER, que se basa en la interacción reversible de las biomoléculas cargadas con los grupos iónicos de carga opuesta de la fase estacionaria.

Cuando las proteínas son expuestas a un pH menor que su punto isoeléctrico (pI), presentan carga positiva y se unen a la fase estacionaria de la columna. Como primer paso debe equilibrarse la columna procurando que todos los iones negativos de la fase estacionaria queden asociados a iones intercambiables de carga opuesta. En un segundo paso se aplica la muestra y se lava con el objetivo de que las proteínas de carga positiva se unan a la fase estacionaria que posee grupos de carga negativa y el material no unido eluya. Es recomendable que el buffer de la muestra tenga el mismo pH y fuerza iónica que el buffer de corrida (eluyente A) para que no se altere el equilibrio iónico ya logrado en la columna y todas las moléculas apropiadamente cargadas se puedan unir. En el tercer paso, la elución, las proteínas unidas son desplazadas gracias a un cambio en la composición del buffer (incremento de la fuerza iónica con NaCl) y separadas en diferentes fracciones. Este proceso ocurre en relación al número de grupos cargados sobre su superficie. Un último paso de regeneración asegura que eluyan las moléculas que pudieron permanecer unidas y se realiza pasando por la columna el buffer que posee el NaCl. La Figura 4 esquematiza el cromatograma teórico correspondiente.



**Figura 3.** Esquema del cromatograma teórico para la columna utilizada. La línea celeste representa el gradiente lineal de NaCl. 1. fracción no retenida; 2. proteínas retenidas; 3. fase de regeneración.

El equipo utilizado fue un ÄKTA Purifier con una columna de intercambio catiónico Hi-Trap SP-HP (Sulpho Propyl sepharose High Performance) de 5 ml. La columna fue equilibrada con buffer fosfato 0,1 M de pH 6,6 y luego se sembraron 500 µl de PER. Las fracciones proteicas se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl (0 - 1,0 M) en 15

volúmenes de columna (VC). La velocidad de flujo fue de 1ml/min y las diferentes fracciones fueron detectadas a 280 y 215 nm y colectadas por separado.

### 1.4. Contenido de proteínas

Se utilizó el método de Bradford (1976), basado en que la unión del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 a las proteínas produce un corrimiento del máximo de absorbancia de 465 nm (forma roja del colorante libre) a 595 nm (forma azul del complejo colorante-proteína). El método resulta especialmente apto para la valoración de proteínas en extractos vegetales, que frecuentemente contienen sustancias de naturaleza fenólica que interfieren con el clásico método de Lowry (Peterson, 1979). Se mezclaron 50 µl de muestra y 2,5 ml de reactivo y se realizaron blancos de reacción con AD. Para cuantificar se confeccionó una curva de calibración utilizando como patrón seroalbúmina bovina en el rango de 100 a 1000 µg/ml (macrométodo). Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. Luego de 10 min de reacción, se hicieron lecturas de absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Agilent 8453.

### 1.5. Actividad caseinolítica

Se mezclaron 1,1 ml de solución de caseína (Sigma) al 1% p/v disuelta en buffer TRIS-HCl 0,1 M de pH 8,5 y 0,1 ml de la preparación enzimática. La reacción fue llevada a cabo a 37 °C y detenida luego de 2 min por la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% p/v. A continuación los tubos fueron centrifugados a 4500 g durante 20 min, determinándose la absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm en una celda de 1 cm de paso utilizando un espectrofotómetro UV-visible Agilent 8453 (López *et al.*, 2001). Los blancos se realizaron agregando el TCA en primer término de manera de inactivar a las enzimas antes de contactarse con el sustrato. En todos los casos las determinaciones se hicieron por triplicado. La actividad se expresó como unidades caseinolíticas/ml (Ucas/ml), que considera la cantidad de enzima requerida para producir un incremento de una unidad de absorbancia a 280 nm al cabo de un min.

### 1.6. Inactivación del PER por tratamiento térmico

Con el objeto de determinar las condiciones de inactivación del PER por tratamiento térmico, las cuales se tendrán en cuenta en los posteriores ensayos de hidrólisis de proteínas alimentarias, se determinó el perfil de actividad caseinolítica luego de someter esta preparación enzimática a una temperatura de 100 °C. Para ello, se tomaron 3 alícuotas de PER y se incubaron previamente en baño de agua a ebullición durante 5, 10 y 15 min respectivamente. Luego se determinó la actividad caseinolítica como se indicó en el apartado 1.5.

### 1.7. SDS-PAGE

La separación de las proteínas del EC de acuerdo a su movilidad electroforética se llevó a cabo en un equipo Miniprotean III (Bio-Rad) de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970). Este método utiliza 2 iones de diferente movilidad electroforética (glicinato y cloruro) que forman una frontera móvil cuando se aplica voltaje. Las proteínas tienen una movilidad intermedia por lo que se concentran primero en una fina zona (stacking), lo que permite tener luego una gran resolución. A medida que la frontera móvil se mueve a través del gel, el efecto de tamiz de la poliacrilamida hace que las proteínas se muevan a diferentes velocidades. El tratamiento de las muestras con  $\beta$ -mercaptoetanol cliva los enlaces disulfuro y el SDS desnatura las proteínas, dejándolas negativamente cargadas y con la misma relación carga-masa, por lo que las proteínas migran y se separan por tamaño.

#### 1.7.1. Preparación de muestras

Las muestras fueron preparadas agregando un volumen de buffer de muestra para electroforesis (Tabla 4) a un volumen de EC. Aquellas con bajo contenido proteico se concentraron por precipitación con 4 volúmenes de acetona a -20 °C y los precipitados se resuspendieron en buffer de muestra para que la concentración final de proteína sea de 1

mg/ml. Las muestras así dispuestas fueron llevadas a ebullición durante 5 min y centrifugadas a 16000 g.

**Tabla 4. Buffer de Muestra**

TRIS	1,57 g
SDS	2 g
β-mercaptoetanol	5 ml
Glicerol al 10% p/v	8 ml
Azul de bromofenol	2 mg
HCl 1 M hasta	pH 6,8
AD hasta VF	100 ml

### 1.7.2. Preparación de los geles

Para moldear los geles se utilizó el soporte provisto por el equipo Mini-Protean III (Bio-Rad). La composición de los sistemas buffer así como la de los geles empleados se indican en las Tablas 5, 6, 7 y 8. Los distintos geles poseen proporciones diferentes de acrilamida y bisacrilamida y se expresan como %T y %C, que se definen a continuación.

- $\%T = (g \text{ acrilamida} + g \text{ bisacrilamida}) \cdot 100 / V_{\text{total}}$
- $\%C = g \text{ bisacrilamida} \cdot 100 / (g \text{ acrilamida} + g \text{ bisacrilamida})$

**Tabla 5. Buffer de los geles de resolución**

TRIS	36,3 g
HCl 1M hasta	pH final 8,8
AD hasta VF	100 ml

**Tabla 6. Buffer de los geles de apilamiento**

TRIS	36,3 g
HCl 1M hasta	pH final 6,8
AD hasta VF	100 ml

**Tabla 7. Gel de resolución (12,5% T)**

Acril-Bis (30:0,8)	4,15 ml
Buffer de resolución	1,25 ml
SDS al 10% p/v	0,1 ml
AD	4,39 ml
PSA al 5% p/v	105 μl
TEMED	5 μl
VF	10 ml

**Tabla 8. Gel de apilamiento (5% T)**

Acril-Bis (30:0,8)	1,16 ml
Buffer de apilamiento	0,87 ml
SDS al 10% p/v	70 μl
AD	4,39 ml
PSA al 5% p/v	105 μl
TEMED	5 μl
VF	10 ml

Se colocaron 5 ml del gel de resolución por placa y sobre esta mezcla se adicionaron 100 μl de n-butanol para nivelar la superficie y facilitar la visualización de la polimerización. Luego que ésta ocurrió se retiró el alcohol por inversión, se lavó la



superficie con AD y se eliminó el exceso con papel de filtro. A continuación se colocó con pipeta la solución del gel de apilamiento y de inmediato los peines formadores de calles.

### 1.7.3. Aplicación de las muestras

Las muestras fueron aplicadas con jeringa Hamilton de 25  $\mu$ l de capacidad y se calculó el volumen necesario para sembrar de 10 a 20  $\mu$ g de proteína por calle (volumen máximo 20  $\mu$ l). Se sembraron 5  $\mu$ l de una solución conteniendo los patrones de peso molecular (PM) indicados en la Tabla 9 (LMW markers, Bio-Rad).

Proteína	PM (kDa)
Fosforilasa b	97,4
Seroalbúmina	66,2
Ovoalbúmina	45,0
Anhidrasa carbónica	31,0
Inhibidor de tripsina	21,5
Lisozima	14,4

### 1.7.4. Condiciones de corrida

La corrida electroforética se desarrolló en una cuba Miniprotean III (Bio-Rad), empleando el buffer descrito en la Tabla 10. La intensidad de corriente fue de 30 mA durante el apilado (“stacking”) y de 60 mA durante la resolución hasta la finalización de la corrida, que se visualizó por la llegada del azul de bromofenol al borde inferior del gel.

TRIS	3 g
Glicina	14,4 g
SDS	1g
AD hasta VF	100 ml

### 1.7.5. Fijación, coloración y decoloración

Una vez completada la corrida, los geles fueron sumergidos durante 2 h en la solución colorante, que actúa también como fijadora (Tabla 11) y luego sometidos a

sucesivos lavados con solución decolorante (Tabla 12) hasta la obtención de un fondo incoloro.

Ácido acético glacial	10 ml
Metanol	40 ml
Coomassie Brilliant Blue R-250	100 mg
AD hasta VF	100 ml

Ácido acético glacial	10 ml
Metanol	34 ml
AD hasta VF	100 ml

### 1.7.6. Estimación de los PM

La estimación de los PM se realizó por comparación con los patrones proteicos de bajo PM (LMW markers, Bio-Rad). La determinación se realizó en base a una curva de calibración obtenida al graficar los logaritmos de los PM de las proteínas estándar en función de la movilidad relativa de cada patrón. Se realizaron y analizaron los densitogramas de las bandas proteicas empleando el programa Scion Image, que convierte la intensidad de color de las bandas presentes en los geles en datos numéricos.

## 1.8. Isoelectroenfoque (IEF) y zimograma

Se realizó el IEF en una Mini IEF Cell, Mod. 111 (Bio-Rad) para obtener un perfil proteico de las muestras en base a sus valores de pI. Las proteínas se desplazan en el gel donde se crea una diferencia de potencial y un gradiente de pH, migrando hacia el ánodo o hacia el cátodo de acuerdo a su carga inicial y se detienen en el punto en que el pH iguala a su pI.

### 1.8.1. Preparación de muestras

Las muestras se concentraron y desionizaron por precipitación con 4 volúmenes de acetona a 0 °C durante 30 min. Luego de centrifugar a 16000 g el sobrenadante obtenido fue eliminado y el precipitado fue resuspendido con un volumen de agua bidestilada, de modo que la concentración de proteína sea de 1 mg/ml.

### 1.8.2. Preparación de los geles

Los geles fueron confeccionados empleando la bandeja formadora de geles del equipo. Para ello se adhiere la cara hidrofóbica de la película plástica (Gel Bond para poliacrilamida, Bio-Rad) al vidrio, empleando una gota de AD para hacer el contacto y el conjunto se invierte sobre la bandeja. La mezcla de reactivos para obtener 2 geles se preparó de acuerdo a la composición detallada en la Tabla 13.

Tabla 13. Gel de IEF

Acrilamida-bisacrilamida (25 %T, 3%C)	2 ml
Glicerol 25% p/v	2 ml
Anfolitos (Biolyte 3-10)	0,5 ml
Agua bidestilada	5,5 ml

La solución se desgasificó durante 5 min empleando una bomba de vacío y luego se le adicionaron 5  $\mu$ l de TEMED, 60  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10% y 200  $\mu$ l de solución saturada de riboflavina para acelerar la polimerización. La mezcla fue depositada con pipeta entre la película plástica adherida al vidrio y la bandeja formadora de geles y se esperó hasta la polimerización total. Los geles se removieron de la bandeja con ayuda de una espátula delgada.

### 1.8.3. Desarrollo del IEF

Se dejó escurrir el agua remanente de las placas y se sembraron las muestras (5 a 10  $\mu$ l), permitiéndose la difusión de las mismas dentro del gel por un lapso de 5 min. Los electrodos de la celda de IEF fueron humedecidos con agua bidestilada; se apoyaron los geles sobre los mismos y se colocó la tapa que permite que la celda quede herméticamente cerrada. El IEF fue llevado a cabo en 3 etapas sucesivas: 15 min a 100 V, otros 15 min a 200 V y 60 min a 450 V.

### 1.8.4. Fijación y coloración

Una vez finalizada la corrida, los geles unidos a su soporte pero ya separados de la placa de vidrio, fueron sumergidos durante 30 min en una solución fijadora (Tabla 14).

**Tabla 14. Solución fijadora**

Ácido sulfosalicílico	4 g
Metanol	30 ml
Ácido tricloroacético	12,5 g
AD hasta VF	100 ml

Una vez fijados, los geles fueron tratados durante 2 h con la solución colorante (Tabla 15) y luego decolorados por lavados sucesivos con solución decolorante I (Tabla 16). Finalmente se procedió a un último lavado con solución decolorante II hasta la obtención de un fondo incoloro (Tabla 17).

**Tabla 15. Solución colorante**

Ácido acético glacial	10 ml
Etanol	27 ml
Coomassie Brilliant Blue R-250	40 mg
CuSO <sub>4</sub>	500 mg
AD hasta VF	100 ml

**Tabla 16. Solución decolorante I**

Ácido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
CuSO <sub>4</sub>	500 mg
AD hasta VF	100 ml

**Tabla 17. Solución decolorante II**

Ácido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
AD hasta VF	100 ml

### 1.8.5. Estimación de los pI

Para la determinación de los valores de pI de las bandas proteicas de las muestras se utilizó una mezcla de proteínas de amplio rango de pI (Broad pI kit, GE) como patrones detallada en la Tabla 18.

Los valores de pI se determinaron realizando una curva de calibración obtenida al graficar los pI de las proteínas patrones en función de la distancia recorrida por éstas en el gel, tomando como referencia la posición del cátodo.

Tabla 18. Patrones de pI

Proteína	pI
Amiloglucosidasa	3,50
Inhibidor de Tripsina	4,55
β-lactoglobulina A	5,20
Anhidrasa carbónica B (bovina)	5,85
Anhidrasa carbónica B (humana)	6,55
Mioglobina (banda ácida)	6,85
Mioglobina (banda básica)	7,35
Lentil lectina (ácida)	8,15
Lentil lectina (media)	8,45
Lentil lectina (básica)	8,65
Tripsinógeno	9,30

### 1.8.6. Zimograma

Para detectar si las bandas observadas en el IEF poseían actividad proteolítica se realizaron zimogramas. Para ello se utilizaron geles sin colorear que fueron incubados sobre una placa de agarosa embebida en caseína durante 30 min a 60 °C. Las zonas de la película de caseína degradadas indican la presencia de proteasas en el gel.

#### 1.8.6.1. Preparación de las placas de agarosa embebidas en caseína

Las placas de agarosa se prepararon sobre una película plástica (Agarose GelBond, Pharmacia) de un tamaño aproximadamente igual al del gel de poliacrilamida. Sobre el lado hidrofílico de la película se depositó una solución de agarosa al 1% p/v en TRIS-HCl 0,05 M de pH 9, conteniendo cisteína 15 mM (relación volumen/superficie: 0,15 ml/cm<sup>2</sup>) a 65 °C. Una vez polimerizada la agarosa, la placa fue sumergida en una solución de caseína al 1% p/v en el mismo buffer durante 20 min y luego fue enjuagada con AD y escurrida durante 10 min (Westergaard *et al.*, 1980).

#### 1.8.6.2. Incubación

El gel de poliacrilamida fue colocado sobre la placa de agarosa-caseína evitando la formación de burbujas entre las superficies en contacto. El conjunto fue colocado dentro de una cámara húmeda y llevado a estufa a 60 °C durante 30 min.

### 1.8.6.3. Fijación y coloración

Luego de ser incubados, los geles fueron separados y la placa de agarosa-caseína sumergida durante 60 min en la solución fijadora (Tabla 19).

Ácido acético glacial	10 ml
Metanol	45 ml
AD hasta VF	100 ml

La placa fue deshidratada entre papeles de filtro Whatman 3MM por aplicación de una presión de 7,5 g/cm<sup>2</sup> durante 20 min. Posteriormente fue secada con aire caliente y sumergida durante 10 a 30 min en solución colorante (Tabla 20).

Coomassie Brilliant Blue R-250	250 mg
Solución fijadora hasta VF	100 ml

Para decolorar la placa se la sumergió en la solución fijadora durante 10 min y luego se secó nuevamente con aire caliente.

## 1.9. Uso de sustratos sintéticos y determinación de constantes cinéticas

Se determinaron las constantes cinéticas  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  evaluando la actividad endoesterásica sobre el sustrato sintético N- $\alpha$ -CBZ-*p*-nitrofenil éster de alanina. El uso de este tipo de sustratos en los cuales están bloqueados tanto el grupo  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> como el  $\alpha$ -COOH del resto aminoacídico (en el último caso con un grupo cromóforo), permite determinar la actividad esterásica respecto al aminoácido que aporta el grupo carboxilo (Silverstein, 1974). El ensayo se llevó a cabo a 37 °C empleando diferentes concentraciones de sustrato (0,25; 0,5; 0,75; 1; 5 y 10 mM). Las mezclas de reacción se armaron de acuerdo a lo indicado en la Tabla 21.

**Tabla 21. Ensayo de actividad sobre *N*- $\alpha$ -CBZ-*p*-nitrofenil éster de Ala**

Tubo de reacción	Muestra	Blanco
Sustrato en acetonitrilo	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Buffer TRIS-HCl 0,1 M, EDTA 2 mM, pH 8,0	1,85 ml	1,85 ml
Muestra	0,1 ml	-
AD	-	0,1 ml

El progreso de la reacción se siguió midiendo la absorbancia del producto a 405 nm a intervalos de 5 s durante 3 min.

Para la determinación de las constantes cinéticas se utilizó la aproximación lineal de Lineweaver Burk que representa el recíproco de la ecuación de la cinética de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Además se definió la unidad enzimática  $U_{CBZ}$  como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por min a 37°C y pH 8,0. Para poder determinar las  $U_{CBZ}$  de la fracción purificada, se utilizó una curva de calibración de absorbancia a 405 nm vs diferentes concentraciones de *p*-nitrofenol, siendo el coeficiente de extinción molar de 15987  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

## 2. Coagulación de la leche

### 2.1. Actividad coagulante de proteínas de la leche bovina

Para la medición de la actividad coagulante se preparó el sustrato con 12,5 g de leche descremada en polvo San Regim disuelta en 100 ml solución de  $CaCl_2$  0,01 M y pH 6,5 a 35 °C. El ensayo de coagulación se llevó a cabo mezclando 1ml de sustrato con 0,1 ml de EC. Se ensayó la actividad coagulante para diferentes diluciones del EC (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16

y 1:20) a 5 temperaturas (25, 30, 35, 45 y 50 °C), registrando en cuántos segundos se obtenía un coágulo. Cada determinación se realizó por triplicado.

Se determinó también la fuerza coagulante, cambiando la proporción de volúmenes de enzima y leche en el ensayo de coagulación a 35 °C, buscando la proporción que coagule en 40 min (Alais, 1984). A modo de referencia se llevó a cabo la misma determinación empleando soluciones de quimosina. Para ello se preparó una solución stock de 50 IMCU (International Milk Clotting Units/ml), disolviendo 0,024 g de quimosina comercial (Chy-Max Extra, 2080 IMCU/g, Hansen) en 1 ml de AD, a partir de la cual se realizaron diluciones. Luego se probó cada una de éstas sobre leche a 35 °C para hallar con cuál se obtenía el coágulo a los 40 min.

Finalmente, se determinó el efecto de la adición de distintas cantidades de  $\text{CaCl}_2$  en la actividad coagulante de la leche en polvo descremada y reconstituida con concentraciones crecientes de solución de  $\text{CaCl}_2$  (0 - 80 mM) a 35 °C y pH 6,5.

## 2.2. Preparación del lactosuero

El suero lácteo fue obtenido coagulando 50 ml de leche con la cantidad suficiente de EC o quimosina para formar el coágulo en 40 min a 35 °C. El cuajo fue dejado por 1 h a temperatura ambiente y luego cortado y centrifugado a 16000 g y 4 °C por 15 min. En cada caso, el suero escurrido fue ultrafiltrado a través de una membrana de 5 kDa de corte (Amicon Ultra tubes, Millipore), fraccionado y almacenado a -20 °C. De este modo se contó con muestras filtradas y no filtradas para la posterior caracterización.

## 3. Hidrólisis controlada de caseínas

Se prepararon hidrolizados de caseína bovina con el PER, en distintas condiciones de temperatura, pH, concentración de enzima y sustrato. Se empleó caseína comercial al



1,25% p/v disuelta en buffer TRIS-HCl 0,1 M pH 9,0 a ebullición durante 20 min y luego se filtró en caliente. Se utilizaron diferentes diluciones del PER y se prepararon hidrolizados de 10, 30, 60, 90 y 180 min. Las hidrólisis se llevaron a cabo en baño a 37 ó 45 °C. En cada tubo se colocó el PER (1 volumen por cada 9 volúmenes de caseína) y se detuvieron las hidrólisis alternativamente agregando TCA al 5% p/v (1 volumen de hidrolizados más un volumen de TCA) o colocando los tubos 10 min a ebullición. Se realizaron dos blancos de reacción: uno donde se colocó AD en lugar de PER (hidrolizado de tiempo 0 min) y otro en el cual se mezclaron PER y caseína precalentadas 10 min a ebullición (blanco de hidrolizado) con la finalidad de inactivar la enzima mientras que el sustrato sea sometido al mismo tratamiento que en los tubos donde la enzima poseía actividad.

Alícuotas de los hidrolizados obtenidos fueron filtradas en tubos Falcon Millipore de 3 kDa de corte. Para ello se los centrifugó a 10 °C y 6500 g durante 30 min. De esta manera se reservaron muestras de hidrolizados filtrados y sin filtrar para realizar las posteriores determinaciones.

## 4. Caracterización de las muestras

### 4.1. SDS-PAGE con tricina

Muestras de lactosuero y de hidrolizados fueron analizadas por SDS-PAGE en geles de tricina. Esta técnica electroforética permite una mejor resolución de péptidos de bajo PM: la tricina es utilizada como ion de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas a concentraciones menores de acrilamida que en el caso del buffer TRIS-glicina, utilizado en la técnica ideada por Laemmli (1970). De esta manera se logra una resolución superior de polipéptidos, sobre todo en el rango de 5 a 20 kDa, sin la necesidad del uso de urea (Schägger & von Jagow, 1987). El gel espaciador permite un cierto grado de desapilamiento de las proteínas mayores de 30 kDa,

garantizándose de esta manera un pasaje más suave al gel de separación y quedando así reducidos los efectos de una carga excesiva. La preparación de las muestras a sembrar se describió en el apartado 1.7.1.

#### 4.1.1. Preparación de los geles

Se emplearon geles de tricina de alta resolución compuestos por un gel de apilamiento, un gel espaciador y un gel de resolución (Tablas 22, 23 y 24). Para caracterizar la composición de los geles se utilizan las expresiones %T y %C descriptas en el apartado 1.7.2.

TRIS	36,3 g
SDS	0,3 g
HCl 1M hasta	pH 8,45
AD hasta VF	100 ml

Acrilamida	48 g
Bisacrilamida	1,5 g
AD hasta VF	100 ml

Reactivos	Gel de apilamiento 6% T y 3% C	Gel espaciador 10% T y 3% C	Gel de resolución 16,5% T y 3% C
Acril-Bis (49,5% T y 3% C)	0,6 ml	2 ml	3,3 ml
Buffer del gel	1 ml	3,3 ml	3,3 ml
H <sub>2</sub> O	3,4 ml	4,7 ml	3,4 ml
PSA 10% p/v	120 µl	120 µl	120 µl
TEMED	12 µl	12 µl	12 µl

#### 4.1.2. Aplicación de muestras y condiciones de corrida

Las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton (10 a 20 µl) y se utilizó una celda Miniprotean III (Bio-Rad) en cuyos reservorios anódico y catódico se colocaron los correspondientes sistemas buffer (Tablas 25 y 26). Se emplearon patrones de PM de bajo rango (LMW markers, Bio-Rad, Tabla 9) o patrones peptídicos (Peptide Marker Kit, GE: horse myoglobin peptides: 16,9; 14,4; 10,7; 8,2; 6,2; 2,5 kDa). Todas las corridas se realizaron a voltaje constante (30 V y 70 mA) durante el apilamiento, aumentando progresivamente el voltaje cada 10 s al ingresar las proteínas al gel de separación hasta

llegar a 100 V (90 mA), valor que se mantuvo constante hasta la finalización de la electroforesis.

**Tabla 25. Buffer anódico**

TRIS	2,42 g
HCl 1M hasta	pH 8,9
AD hasta VF	100 ml

**Tabla 26. Buffer catódico**

TRIS 0,1 M	1,21 g
Tricina 0,1 M	1,79 g
SDS	0,10 g
AD hasta VF	100 ml

#### 4.1.3. Fijación y coloración

Se realizó de acuerdo a una técnica para tinción de pequeños péptidos. Los geles se dejaron 30 min en solución fijadora (Tabla 27) luego se colocaron en solución colorante (Tabla 28) aproximadamente una h y finalmente se decoloraron 3 veces de 15 min cada una con solución decolorante (Tabla 29). Los geles fueron escaneados y se calcularon los PM de los principales péptidos por comparación con los patrones.

**Tabla 27. Solución fijadora**

Metanol	400 ml
Ácido acético	100 ml
Agua desionizada	500 ml

**Tabla 28. Solución colorante**

Ácido acético	100 ml
Coomasie Brilliant Blue G250	0,25 g
Agua desionizada	900 ml

**Tabla 29. Solución decolorante**

Ácido acético	100 ml
Agua desionizada	900 ml

## 4.2. Determinación de la concentración de péptidos

Se empleó el método de Lowry (1951), para estimar la concentración de péptidos presentes tanto en las muestras de lactosuero como en los hidrolizados de caseínas. Esta técnica se basa en que el Cu II en medio alcalino forma un complejo estable color violeta con los N de las uniones peptídicas (reacción de Biuret); adicionalmente, se produce la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico) por la oxidación de tirosina, triptófano y cisteína de las cadenas polipeptídicas. Los quelatos de Cu en la estructura del péptido facilitan la transferencia de electrones de los grupos amino

al cromóforo ácido (Figura 4). Como resultado de ambas reacciones, este reactivo en presencia de péptidos absorbe a 750 nm.

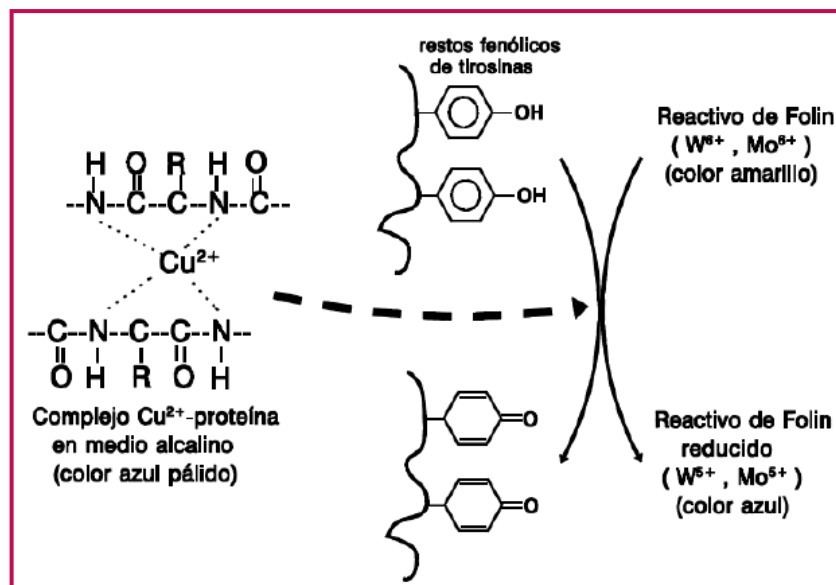


Figura 4. Representación esquemática de la reacción de Lowry.

Las muestras de hidrolizados filtrados fueron diluídas 1:5 con AD, mientras que las de los hidrolizados sin filtrar y las de lactosuero se diluyeron 1:50. Se utilizó como “reactivo A” 50 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% p/v en NaOH 0,1 N. Como “reactivo B” 0,5 ml de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1,0% p/v más 0,5 ml de tartrato de Na y K 2% p/v. Los reactivos A y B se mezclaron en el momento de realizar la reacción (“solución AB”). Se mezclaron 200  $\mu\text{l}$  de muestra con 1 ml de solución AB en tubos, se agitaron en vórtex y se dejaron reposar 10 min. A continuación se agregaron 100  $\mu\text{l}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu diluído 1:1 con AD. Luego de agitar y dejar reposar 30 min se midió absorbancia a 750 nm. La curva patrón se realizó con soluciones de albúmina (0, 50, 100, 200, 300 y 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Todas las determinaciones fueron hechas por triplicado.

### 4.3. Determinación del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis se define como el porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados con respecto a la proteína original y es una propiedad importante ya que determina

muchas de sus características. Se empleó el método del ácido trinitrobenzeno sulfónico (TNBS) basado en su reacción con los grupos amino primarios que quedan expuestos al hidrolizarse los enlaces peptídicos, resultando en un cromóforo que se sigue por espectrofotometría. Las muestras de hidrolizados sin filtrar (0, 10, 30, 60, 90 y 180 min) se centrifugaron 10 min a 16000 g, los sobrenadantes se diluyeron 1:10 con buffer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2125 M de pH 8,2 con SDS al 1% p/v, para obtener una concentración aproximada de 1mg/ml de proteína. Se realizó una curva de calibración con soluciones patrón de leucina (0,225; 0,45; 0,9; 1,125; 1,5 y 2,25 mM). Se mezclaron 320 µl de buffer, 40 µl de muestra y 320 µl de TNBS (diluido 1:200 en AD) y se incubaron 1 h en ausencia de luz a 50 °C. Luego se agregaron 640 µl de HCl 0,1M, se dejó reposar 1 h a temperatura ambiente en oscuridad y se realizó la lectura de absorbancia a 340 nm. Se calculó el grado de hidrólisis porcentual como:

$$\text{GH}\% = 100 \cdot (\text{NH}_{2=t} - \text{NH}_{2\ t=0}) / (\text{NH}_{2\infty} - \text{NH}_{2\ t=0})$$

siendo NH<sub>2=t</sub>, NH<sub>2 t=0</sub> y NH<sub>2∞</sub> los equivalentes de leucina al tiempo considerado (t), a tiempo cero y a tiempo final, respectivamente (Adler-Nissen,1979). El valor de NH<sub>2∞</sub> fue estimado como:

$$\text{NH}_{2\infty} = (1/M_{\text{aa}}) \cdot (1+f_{\text{Lys}}) \cdot C_{\text{prot}}$$

donde M<sub>aa</sub> es el promedio de los PM de los aminoácidos en las caseínas (130 g/mol), f<sub>Lys</sub> es la proporción de lisina en estas proteínas (1/15) (Bresani, 1994) y C<sub>prot</sub> (g/l) es la concentración de proteínas en la muestra.

#### 4.4. Análisis cromatográfico de los péptidos obtenidos

Los perfiles peptídicos de los hidrolizados de caseínas se analizaron por RP-HPLC en un equipo ÄKTA Purifier empleando una columna Phenomenex Bondclone 10 C18 (fase estacionaria no polar, formada por cadenas de 18 carbonos, tamaño de partícula 10 µm) de 3,5 ml. Este tipo de columna permite la elución en primer lugar de los péptidos más polares que son menos afines con el relleno, y posteriormente las fracciones peptídicas menos polares. La respuesta del detector es expresada en forma de picos por el software del equipo obteniéndose así los respectivos cromatogramas.

Se empleó como eluente A una solución de agua-ácido trifluoroacético (TFA, 0,5 ml/l) y como eluente B acetonitrilo-TFA (0,25 ml/l). Se obtuvieron los perfiles de todos los hidrolizados equilibrando la columna con 2 volúmenes de A. Luego se inyectaron 0,1 ml de muestra y se eluyeron las fracciones peptídicas con un gradiente de 0-100% de B en 35 VC a una velocidad de flujo de 2ml/min. Posteriormente se realizaron ajustes en el programa de elución para obtener una mejor resolución de los péptidos, utilizando un gradiente quebrado de 2 etapas: de 0 a 9% de B en 4 VC y de 9 a 33% de B en 25 VC. En todos los casos las diferentes fracciones fueron detectadas a 280 y 215 nm.

### 4.5. Espectrometría de masas

Se cortaron con bisturí las bandas presentes en los geles de SDS-PAGE que resultaron de interés y se analizaron mediante la obtención de los PMF (Peptide Mass Fingerprinting) correspondientes. Para ello, los trozos de gel fueron desteñidos con buffer bicarbonato. Posteriormente se hizo una reducción y carbamidometilación con ditiotretitol (DTT) y iodoacetamida, respectivamente. La digestión se llevó a cabo con tripsina y los péptidos fueron analizados por MALDI-TOF (con Reflectrón a 25 kV de voltaje de aceleración) con matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) en placa Ground Steel.

Por otra parte se obtuvo el espectro de masas de algunos hidrolizados de caseína seleccionados, así como el de algunos picos provenientes de las RP-HPLC que resultaron de mayor interés. Para estos ensayos las muestras fueron previamente desaladas empleando columnas ZipTip C18. Luego se mezclaron con una matriz de ácido 2,4-hidroxicinámico en una proporción 1:1 (0,5  $\mu$ l: 0,5  $\mu$ l). Se depositó 1  $\mu$ l sobre una placa Ground Steel y se analizó la muestra con Reflectrón a 25kV. La adquisición de los espectros se llevo a cabo usando el kit de calibración externa Peptide Calibration Standard del equipo MALDI-TOF/TOF ultrafleXtreme (Bruker).

Todos los espectros de masas fueron realizados en el Centro de Proteómica y Bioinformática de la UAB, España, miembro de Proteo Red. Posteriormente, los datos fueron analizados con herramientas de bioinformática de los sitios web [www.expasy.org](http://www.expasy.org) y [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com) con la finalidad de poder realizar una identificación de los

principales péptidos de interés. Las posibles secuencias de los péptidos se compararon con datos de péptidos bioactivos ingresados en la base BIOPEP ([www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep](http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep)).

## 5. Búsqueda de actividades biológicas en el lactosuero y en los hidrolizados de caseína

### 5.1. Actividad antioxidante: técnica de reducción del DPPH

Para detectar la posible actividad antioxidante en los hidrolizados se evalúa la desaparición (neutralización) del radical libre difenilpicrilhidracil (DPPH<sup>•</sup>), que es liposoluble y de color violeta y al ser neutralizado vira a amarillo. Se preparó una solución de 25 µg/ml en etanol (Choi *et al.*, 2002) y luego se filtró. Las muestras se precipitaron con 3 volúmenes de etanol a -20 °C durante 24 h. Luego de centrifugar a 16000 g 30 min se recuperaron los sobrenadantes para realizar las determinaciones. La reacción se llevó a cabo mezclando 0,9 ml del reactivo DPPH con 0,1 ml de cada muestra (M). Se realizaron 2 tipos de blancos: un blanco de muestra (B<sub>M</sub>) con 0,9 ml de reactivo y 0,1 ml de etanol y blancos de reactivo (B<sub>R</sub>) con 0,9 ml de etanol y 0,1 ml de muestra. Se utilizaron como estándares soluciones de ácido ascórbico de concentraciones comprendidas entre 0,1 y 0,001 mg/ml. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente determinando la absorbancia a 517 nm. Se calculó el porcentaje de actividad antioxidante (%AA) empleando la siguiente ecuación:

$$\%AA = 100 \cdot [1 - (AM - AB_R) / AB_M]$$

donde AM, AB<sub>R</sub> y AB<sub>M</sub> son las medidas de absorbancia a 517 nm de las muestras, blancos de reactivo y blancos de muestra, respectivamente.

## 5.2. Actividad antioxidante: método de la inhibición de la decoloración del $\beta$ -caroteno

Se empleó el método de *Tepe* (*Tepe et al.*, 2005) con modificaciones. En este ensayo se utiliza ácido linoleico en un medio que le provoca la pérdida de un H de uno de sus grupos metileno dialílicos, formándose hidroperóxidos. Los radicales libres que resultan de estos hidroperóxidos, en ausencia de un antioxidante, atacan las insaturaciones del  $\beta$ -caroteno. Así, al perder sus dobles enlaces, el  $\beta$ -caroteno pierde su cromóforo y consecuentemente su color naranja característico. Si la muestra a ensayar actúa como antioxidante, previene la extracción de H al ácido linoleico (poder reductor), por lo que no se produce la oxidación del  $\beta$ -caroteno (*Bhalodi et al.*, 2008).

Para la determinación se disolvieron 0,8 mg de  $\beta$ -caroteno en 4 ml de cloroformo; luego se agregaron 80 mg de ácido linoleico y 800 mg de Tween 20. El cloroformo fue eliminado bajo campana a 40 °C y finalmente se adicionaron 200 ml de AD saturada con oxígeno. La mezcla de reacción se preparó colocando en tubos 2,5 ml del reactivo y 0,1 ml de muestra a 50 °C. Se realizó un blanco con AD y controles positivos con ácido ascórbico (0,1 - 0,0001 mg/ml). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Se determinó absorbancia a 470 nm ( $A_{470}$ ) a los 0, 30, 60, 90 y 120 min de reacción. Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad antioxidante (%AA) de acuerdo a la siguiente ecuación (*Vidal et al.*, 2006):

$$\%AA = 100 - \{(A_{0M} - A_{120M}) / (A_{0B} - A_{120B})\} \cdot 100\}$$

donde  $A_{0M}$  y  $A_{0B}$  representan la  $A_{470}$  a los 0 min de reacción de las muestras y del blanco respectivamente.  $A_{120M}$  y  $A_{120B}$  corresponden a la  $A_{470}$  a los 120 min de reacción de las muestras y del blanco.

En los casos correspondientes a la actividad antioxidante donde la interpretación de los datos resultó dificultosa, éstos fueron analizados mediante un test de ANOVA de una vía (programa on-line disponible en <http://vassarstats.net/>). Cuando las diferencias resultaron significativas ( $p < 0,01$ ), los valores medios fueron evaluados mediante el test de Tukey HSD (Honestly Significant Difference) comparándolos de a pares (*Di Renzo et al.*, 2000).



### 5.3. Determinación de la actividad inhibitoria de la ECA

La actividad antihipertensiva de los hidrolizados fue evaluada *in vitro* como la capacidad para inhibir la actividad de la ECA. Para ello se realizó un ensayo basado en la transferencia de energía de fluorescencia por resonancia (Fluorescence Resonance Energy Transfer: FRET).

Un fluoróforo donador puede transmitir la energía de excitación a un aceptor, siempre y cuando su espectro de emisión se superponga con el espectro de absorción del aceptor y además se sitúen en la misma molécula. En el ensayo, se empleó el péptido fluorogénico Abz-PheArgLys(Dnp)Pro-OH, que es sustrato de la ECA. El ácido o-aminobenzoico (Abz) actúa como grupo donador capaz de transferir energía de resonancia al aceptor 2,4-dinitrofenil (Dnp) presente en el mismo péptido. La desactivación o “quenching” es la disminución de la intensidad de fluorescencia. Así, este péptido no exhibe fluorescencia cuando está intacto pero el clivaje de cualquier enlace peptídico entre el par donador-aceptor, libera la fluorescencia que puede ser detectada de manera continua, permitiendo obtener un análisis cuantitativo de la actividad enzimática (Figura 5).

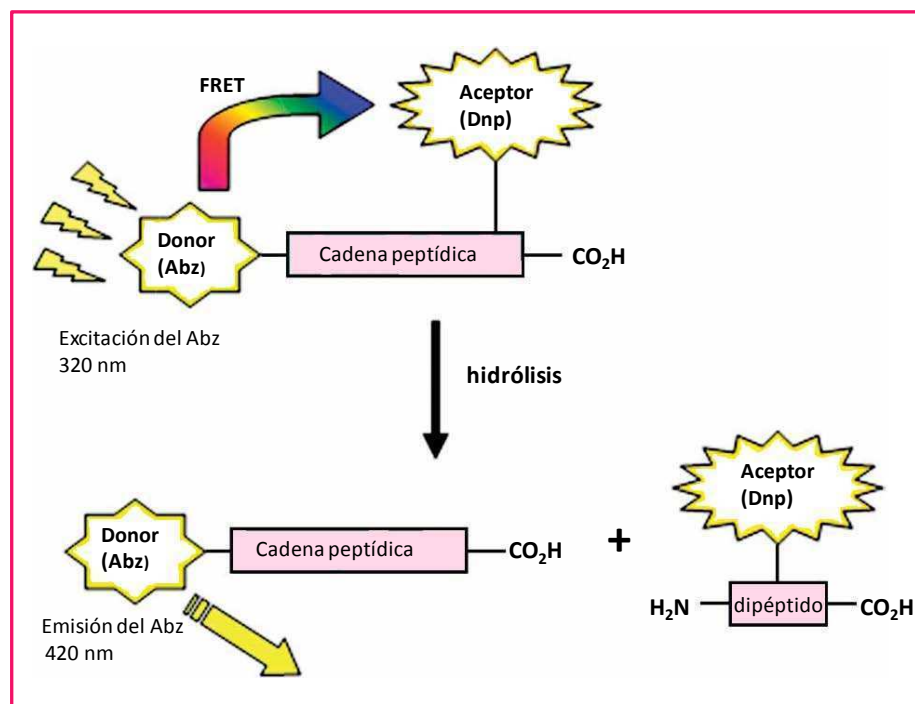


Figura 5. Mecanismo FRET

Para la mezcla de reacción se preincubaron 3  $\mu\text{l}$  de ECA de 1 U (U: unidad internacional, Sigma) con 25  $\mu\text{l}$  de cada uno de las muestras filtradas con membrana de 3 kDa o AD en el caso del blanco de enzima ( $B_E$ ) durante 30 min a 37 °C. Esta mezcla se agregó a 2,97 ml de buffer TRIS-HCl 0,1 M pH 7, conteniendo 50 mM de NaCl y 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$  a 37 °C. Luego se adicionaron 2  $\mu\text{l}$  del sustrato Abz-PheArgLys(Dnp)Pro-OH disuelto en DMSO (1 mg/ml). Como control positivo se emplearon diluciones del inhibidor comercial captopril (stock 1 mM). La reacción fue monitoreada en un espectrofluorómetro excitando la muestra a 320 nm y detectando la luz emitida a 420 nm (Carmona *et al.*, 2006). El incremento de fluorescencia se registró durante el tiempo en que se manifestó una relación lineal entre ambos parámetros (entre 3 y 4 min). Una mayor emisión de fluorescencia indica una mayor actividad de la ECA. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. Se tomó el valor de la pendiente de la determinación del  $B_E$  como 100% de actividad o 0% de inhibición de la actividad de la ECA.

Finalmente se determinó el valor de la  $\text{IC}_{50}$  para las muestras que resultaron de mayor interés. Para ello se realizó el ensayo empleando distintas diluciones de las mismas y se graficó el porcentaje de inhibición de la ECA en función de la concentración de péptidos determinada por el método de Lowry. Se linealizaron los datos mediante uso de una escala semilogarítmica y/o logarítmica y se calculó la concentración de hidrolizado que corresponde a un 50% de inhibición de la ECA.



## Resultados y Discusión

• • •

# 1. Obtención y caracterización de extractos proteolíticos de *Maclura pomifera*

## 1.1. Preparación del EC y determinación de actividad

En los meses de marzo y abril de 2010 se recolectaron frutos de *M. pomifera* en la ciudad de La Plata y a partir del látex se prepararon 3 EC diferentes. Se estimó la actividad caseinolítica (expresada en Ucas/ml) y se determinó la concentración total de proteínas (mg/ml) por el método de Bradford. Con estos datos pudo calcularse la actividad específica, que fue expresada en Ucas/mg de proteína. En marzo de 2011 y de 2012 se procedió de la misma manera obteniendo 3 nuevos EC. En la Tabla 30 se detallan los datos de actividad caseinolítica, concentración de proteínas y actividad específica.

Extracto N° Fecha	Actividad caseinolítica (Ucas/ml)	Concentración de proteínas (mg/ml)	Actividad específica (Ucas/mg)
1. 19/03/2010	4,0 ± 0,7	1,19 ± 0,03	3,4 ± 0,6
2. 22/03/2010	2,1 ± 0,4	0,86 ± 0,07	2,4 ± 0,5
3. 09/04/2010	2,1 ± 0,4	0,75 ± 0,02	2,8 ± 0,6
4. 16/03/2011	6,6 ± 2,2	No determinado	No determinado
5. 16/03/2012	17,7 ± 0,6	2,34 ± 0,11	7,6 ± 0,5
6. 22/03/2012	26,0 ± 1,9	3,39 ± 0,52	7,7 ± 1,3

**Tabla 30.** Actividad enzimática y concentración proteica de los EC. Los valores se expresan como promedio de 3 determinaciones ± DS. Diluciones empleadas para el ensayo de actividad: años 2010 y 2011, 1:10; año 2012, 1:20. Diluciones empleadas para el método de Bradford: años 2010 y 2011, 1:2; año 2012, 1:3 (curvas de calibración, ver Anexo, Figuras A y B).

Se observa una amplia variabilidad en los valores de actividad y concentración de proteínas obtenidos para los distintos EC. Esto es propio de los extractos vegetales, ya que la cantidad y composición del látex en el fruto es variable de acuerdo al lote recolectado y al grado de madurez (López & Lazza, 2009). Además, durante la preparación de los EC influyeron diversos factores como el número y tamaño de los frutos empleados, la cantidad de látex extraída por fruto y el tiempo que demandó el proceso. La manipulación

del látex de *M. pomifera* no resulta sencilla, debido a sus características adhesivas. Altuner *et al* (2012) reportaron la pérdida de grandes cantidades de sustancias activas al procesar este látex, ya que gelifica rápidamente y queda fuertemente adherido a los tubos, pipetas y otros materiales de trabajo. Por otra parte, para evitar la autodigestión durante la preparación y el almacenamiento del EC, se trabajó sobre hielo y a pH 6,6, por ser éste un valor alejado del rango óptimo (9,3 - 10,3, López & Lazza, 2009). Además, el EDTA adicionado al buffer de extracción bloqueó la acción de fenoloxidasas, siempre presentes en extractos vegetales.

Se observa que los EC preparados en 2012 presentaron una actividad 3 ó 4 veces mayor que los anteriores. Esto se debería a que el lote de frutos empleado exudó una mayor cantidad de látex, pero los volúmenes finales a los que se llevó la preparación fueron los mismos en todos los casos. Así, estos extractos resultaron con una mayor concentración de enzimas proteolíticas.

## 1.2. Efecto del tiempo de almacenamiento

Como para la realización de este trabajo se utilizó mayormente el EC del 19/3/2010, se controló periódicamente su actividad encontrándose una considerable disminución de la misma en función del tiempo de almacenamiento (-20 °C). Así, luego de 6 meses, se observó que la actividad específica había disminuido de  $3,4 \pm 0,6$  a  $1,7 \pm 0,4$  Ucas/mg, mientras que la concentración de proteína total varió de  $1,19 \pm 0,03$  a  $0,99 \pm 0,01$  mg/ml (curva de calibración: ver Anexo, Figura C). Al cabo de 2 años de almacenamiento la actividad resultó no detectable.

## 1.3. Preparación de PER y determinación de actividad

Los extractos vegetales contienen una gran cantidad de componentes que pueden interferir en la purificación de las proteínas de interés o en ensayos posteriores, entre los que se cuentan diferentes metabolitos secundarios, compuestos fenólicos y oxidasas (Wang *et al.*, 2008). La precipitación fraccionada con solventes orgánicos resulta por lo

general muy útil para concentrar las proteínas de una muestra y como se eliminan proteínas contaminantes, el procedimiento permite alcanzar un incremento de entre 2 y 10 veces en la actividad específica (López *et al.*, 2009). En este caso, como se trabajó con enzimas proteolíticas de látex, resultó conveniente eliminar cualquier resto celular y aquellos residuos insolubles como las gomas, procurando preservar la actividad enzimática. Por lo tanto, se optó por obtener un extracto parcialmente purificado mediante precipitación etanólica, empleando una relación 1:1 de EC y etanol (proporción que permite un mayor rendimiento en actividad, Bertucci, 2012), resuspendiéndose luego en 1 volumen del mismo buffer de partida. Al extracto resultante se lo denominó precipitado etanólico redissuelto (PER). Posteriormente, se determinaron la concentración de proteínas por el método de Bradford (curvas de calibración en Anexo, Figuras B y C) y la actividad caseinolítica.

La actividad enzimática del PER con respecto a la del EC de partida resultó muy variable, recuperando 36% de la misma en el PER preparado en 2010 y 62% en el de 2012. Por otro lado, la actividad específica del PER no siempre resultó ser mayor que la del EC: para el obtenido en 2010 se verificó un aumento de la misma desde  $1,7 \pm 0,4$  Ucas/mg en el EC hasta  $2,7 \pm 1,2$  en el PER, mientras que en el PER de 2012 respecto de su EC de partida se observó una disminución de  $7,6 \pm 0,5$  a  $7,0 \pm 0,2$  Ucas/mg. Esto podría explicarse considerando que la actividad en el PER resultó ser muy dependiente de la eficiencia de evaporación del etanol. La variabilidad en los valores obtenidos se relacionaría con la cantidad de etanol remanente en cada caso ya que este solvente orgánico puede acceder al interior de las proteínas y alterar las interacciones hidrofóbicas provocando su desnaturalización (Lehninger *et al.*, 2005).

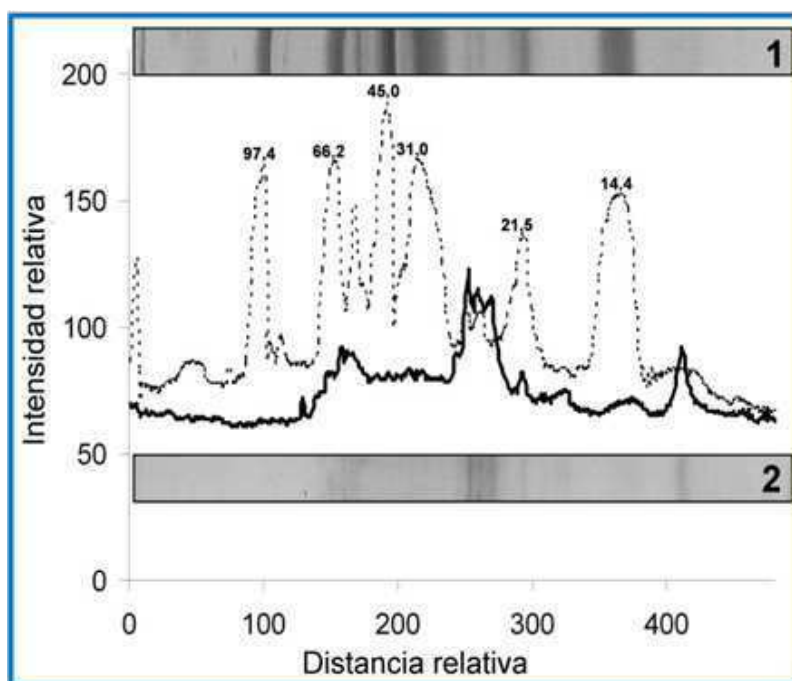
#### 1.4. Tratamiento térmico para la inactivación de la preparación enzimática

Para determinar el tiempo de inactivación del PER a 100 °C, se llevó a cabo un ensayo de calentamiento a diferentes tiempos. De esta manera se determinó que la actividad proteolítica desaparece totalmente luego de 10 min de tratamiento térmico. Este

comportamiento es similar al observado para una preparación comercial conteniendo una proteasa serínica alcalina de *Bacillus Licheniformis* (Bezawada *et al.*, 2011). Por otra parte la proteasa cisteínica papaína obtenida del látex de *Carica papaya* requiere un tiempo ligeramente mayor para ser inactivada (15 min a 100°C, Hou *et al.*, 2010), mientras que la asclepaína, peptidasa cisteínica extraída del látex de *Asclepias fruticosa* L., resulta ser mucho más sensible a la temperatura, inactivándose rápidamente luego de 5 min de tratamiento a 80 °C (Trejo *et al.*, 2001).

## 1.5. SDS-PAGE

Para continuar con la caracterización del EC se realizó un SDS-PAGE y a partir de las bandas proteicas obtenidas se confeccionó el correspondiente densitograma. La Figura 6 muestra dos calles del SDS-PAGE: la del EC (1) y la de los marcadores de PM (2) y sus correspondientes densitogramas (línea punteada y continua, respectivamente). Se observa la presencia de 5 bandas proteicas mayoritarias de PM 56,1; 29,5; 27,9; 26,1 y 9,2 kDa.



**Figura 6.** SDS-PAGE. Los valores de PM están expresados en kDa. **1.** Marcadores de PM (densitograma de línea punteada). **2.** EC (densitograma de línea continua).

En un estudio previo, el análisis electroforético de un EC de esta muestra inhibida con fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF, un inhibidor comercial de peptidasas serínicas), mostró bandas correspondientes a pesos moleculares mayores (71,2; 69,9; 69,7 y 62,7 kDa), típicas de fitopeptidasas serínicas (López *et al.*, 1993). Como los resultados del presente trabajo fueron obtenidos con el EC sin inhibir, las bandas observadas serían producto de una autodegradación parcial de la enzima, lo que explicaría la aparición de fracciones de PM menores. Este hecho, sin embargo, no produjo una inactivación de la enzima, por lo que podría pensarse que el sitio catalítico permanecería activo.

## 1.6. IEF con zimograma

La Figura 7 muestra el IEF del EC (línea 2) donde se observa la presencia de varias bandas proteicas de pI 3,7; 4,2; 4,5; 5,5; 6,0; 6,5; 7,3; 8,0; 8,7 y 9,2, siendo de mayor intensidad las de pI 8,7 y 4,2.

En el zimograma (línea 3) se comprueba que las bandas de pI  $\geq 6,0$  y la de pI 4,2 poseen la mayor actividad caseinolítica, ya que es en estas zonas del gel donde se visualiza una gran degradación del sustrato, con el consecuente aclaramiento de la placa de agarosa.



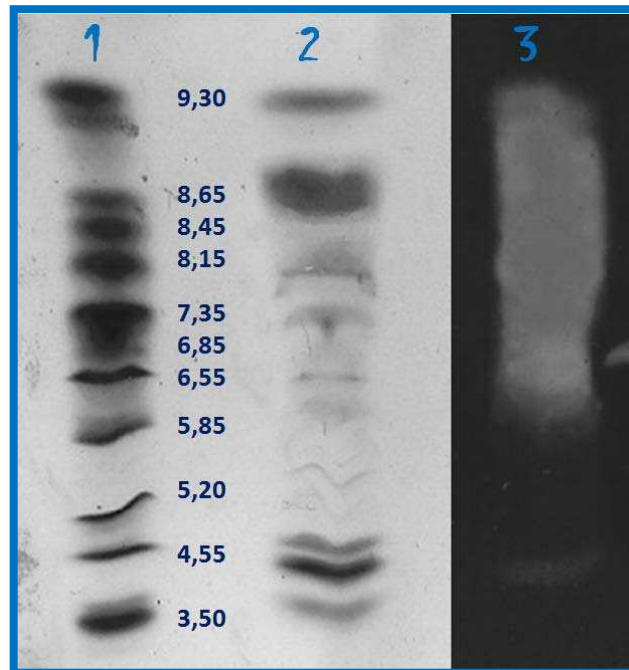
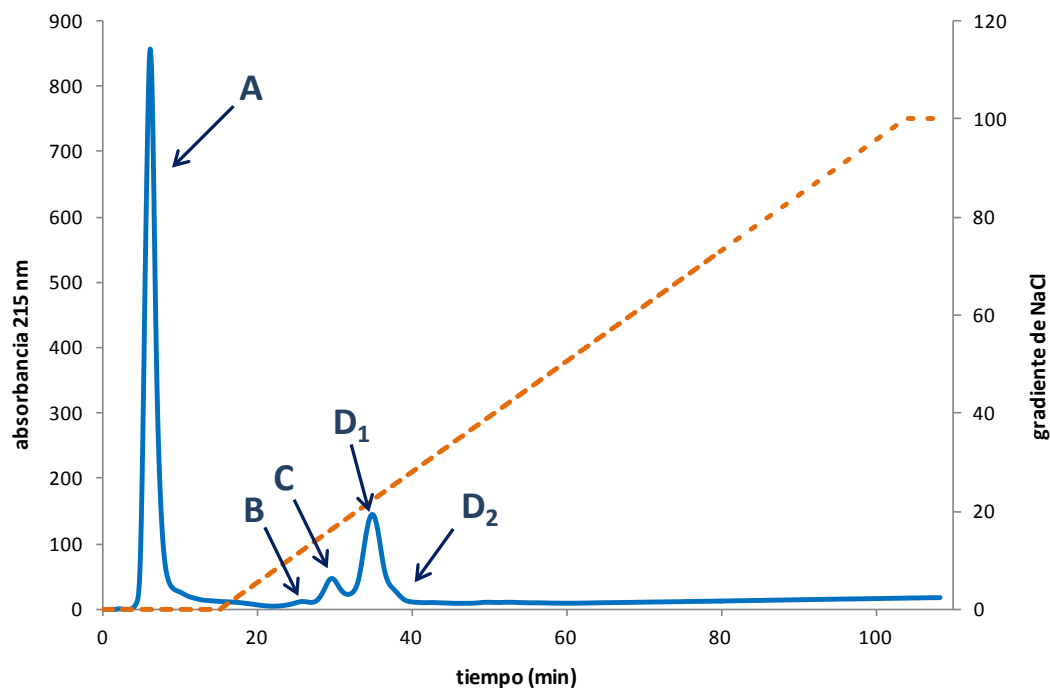


Figura 7. IEF-zimograma del EC. Línea 1. Marcadores de pI. Línea 2. EC. Línea 3. Zimograma.

### 1.7. Purificación cromatográfica de una peptidasa

Con la finalidad de purificar alguna de las fracciones de pI más alcalino observadas en el IEF se empleó la técnica cromatográfica de intercambio catiónico. La muestra sembrada en la columna fue PER y las fracciones proteicas se eluyeron en orden de pI creciente.

El cromatograma obtenido (Figura 8) mostró un pico no retenido (A), donde se encontrarían las proteínas de pI menor que el pH del buffer de corrida (6,6). Los picos B y C corresponderían a las bandas de pI 7,3 y 8,0, mientras que el pico D presentaría las fracciones de pI 8,7 (D<sub>1</sub>) y 9,2 (D<sub>2</sub>).



**Figura 8.** Cromatografía de intercambio catiónico del PER. Columna Hi-Trap SP-HP, 5 ml. Gradiente de NaCl (0 - 1,0 M en 15 VC).

Para verificar la identidad de las fracciones proteicas se realizaron IEF, cuyos resultados no fueron totalmente concluyentes. Debido a que las muestras se encontraban en buffer fosfato, que precipita junto con las proteínas durante la preparación de las muestras para el IEF, éstas corrieron distorsionadas impidiendo una buena resolución del patrón de bandas. A pesar de la distorsión del gel, pudo inferirse que la muestra correspondiente al centro del pico D ( $D_1$ ) sería la proteína de pI 8,7. En ensayos posteriores se procedió a eliminar el fosfato, pero las muestras resultaron muy diluidas por lo que no pudieron visualizarse bandas en el gel.

## 1.8. Ensayos de cinética enzimática

Se utilizó como muestra el pico  $D_1$  que fue obtenido en cantidad suficiente en cromatografías donde el gradiente empleado fue el mismo que en la sección 1.7., pero el volumen de PER sembrado en la columna fue mayor (1ml de PER; 3 corridas cromatográficas). Los ensayos de cinética se realizaron con el sustrato sintético N- $\alpha$ -CBZ-

p-nitrofenil éster de alanina, ya que en estudios previos se demostró que de 9 derivados de distintos aminoácidos, el EC degradaba preferencialmente el de alanina, alcanzando valores de actividad muy elevados (López, 1995).

La Figura 9 muestra la curva de variación de la velocidad de formación de producto de hidrólisis en función de la concentración de sustrato, donde se puede apreciar un comportamiento de tipo michaeliano.

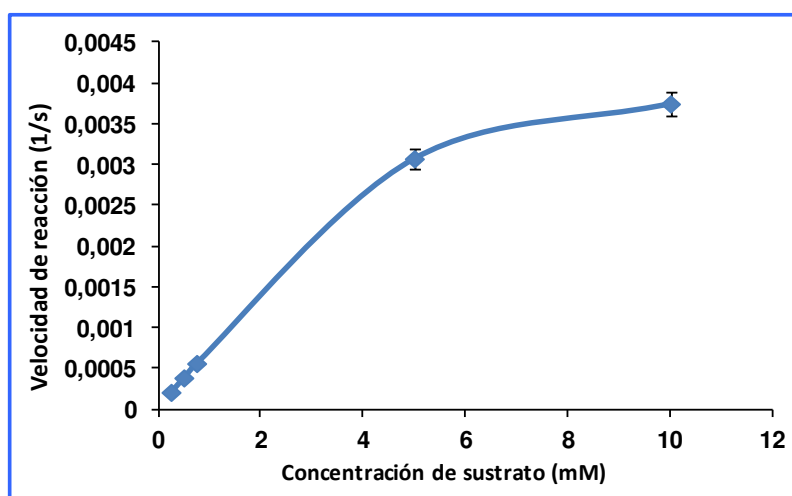


Figura 9. Cinética de hidrólisis del N- $\alpha$ -CBZ-*p*-nitrofenil éster de alanina. Los resultados se expresan como promedio de 3 determinaciones  $\pm$  DS.

Figura 10 presenta el gráfico de la inversa de la velocidad de reacción en función de la inversa de la concentración de sustrato (aproximación lineal de Lineweaver Burk) para la determinación de las constantes cinéticas. Los valores obtenidos fueron un  $K_M$  de  $6,98 \pm 0,31$  mM y una  $v_{m\acute{a}x}$  de  $0,0060 \pm 0,0003$   $s^{-1}$ .

Por otra parte, se realizó el análisis de los datos de velocidad en función de la concentración de sustrato utilizando el programa SigmaPlot 10.0 para aproximar a una hipérbola, obteniéndose los valores de  $5,37 \pm 1,68$  mM para el  $K_M$  y  $0,0059 \pm 0,0008$   $s^{-1}$  para la  $v_{m\acute{a}x}$ . Se pudo observar que las 2 aproximaciones arrojaron valores muy similares para la  $v_{m\acute{a}x}$ , aunque ligeramente diferentes para el  $K_M$ .

Las  $v_{m\acute{a}x}$  también se expresaron en  $U_{CBZ}$  empleando como coeficiente de extinción molar la pendiente de una curva de calibración de paranitrofenol ( $15987$   $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ ). Se

obtuvieron  $0,45 U_{CBZ} \pm 0,02$  para el valor calculado por aproximación lineal y  $0,44 \pm 0,06 U_{CBZ}$  para el calculado por aproximación hiperbólica.

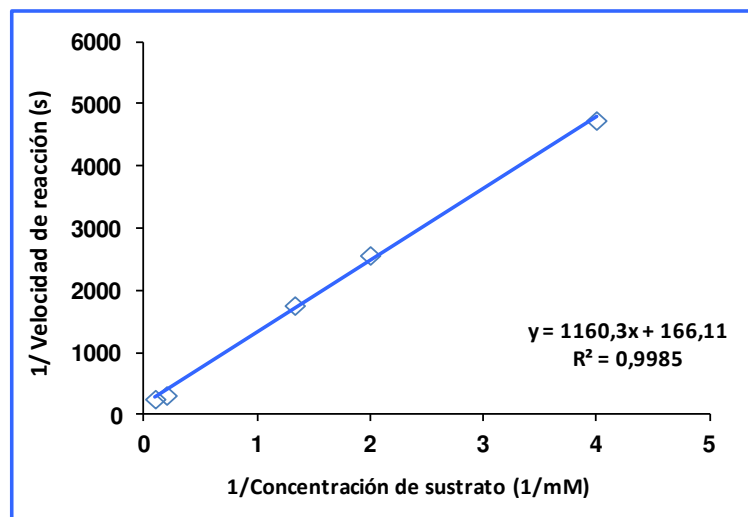
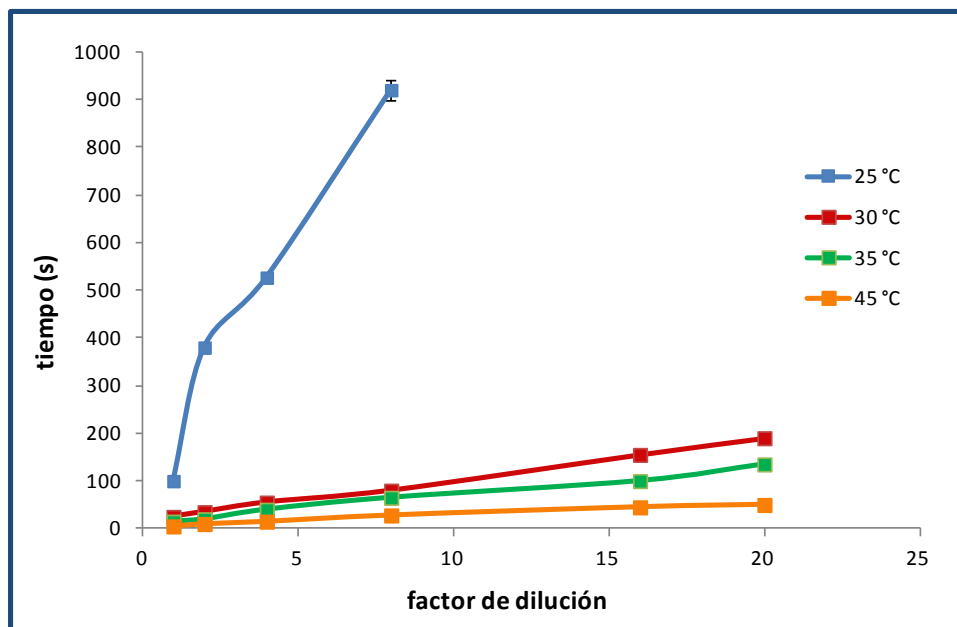


Figura 10. Aproximación lineal de Lineweaver Burk para la determinación de  $K_M$  y  $v_{m\acute{a}x}$ .

## 2. Aplicaciones de los extractos proteolíticos sobre proteínas de leche

### 2.1. Coagulación de la leche bovina

La Figura 11 muestra los resultados de los ensayos de coagulación a diferentes temperaturas para las distintas diluciones del EC. En primer lugar, se encontró una dependencia lineal entre el tiempo de coagulación y la dilución de la preparación enzimática a 30, 35 y 40 °C. A 25 °C se observa un notable incremento en el tiempo necesario para la formación del coágulo respecto a los ensayos realizados a mayor temperatura. Por otra parte, a 50 °C la coagulación ocurrió en forma instantánea, con excepción de la dilución 1:20 del EC que tardó 30 s.



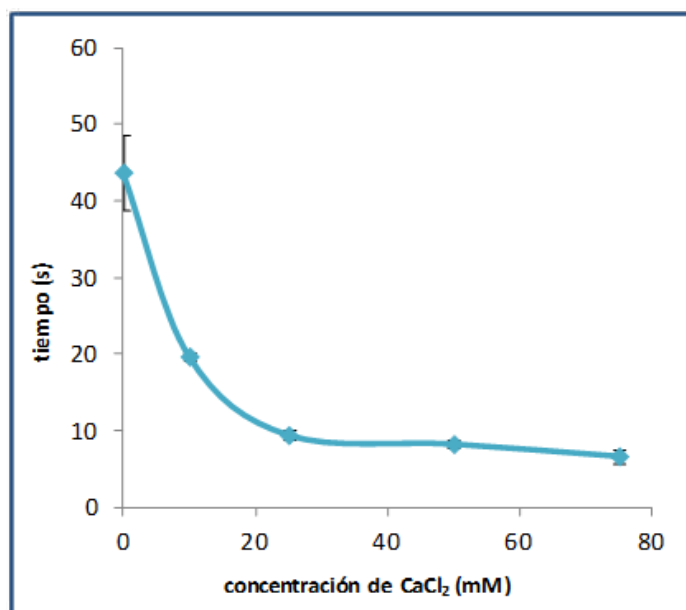
**Figura 11.** Efecto de la temperatura sobre el tiempo de coagulación de la leche empleando diferentes diluciones del EC. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Las barras verticales muestran el DS, que en la mayoría de los casos fue despreciable.

El efecto coagulante del EC observado es superior al obtenido para un extracto de *Bromelia hieronymi*, una especie estudiada en nuestro laboratorio que posee proteasas cisteínicas, cuyos tiempos de coagulación resultan ser más de 10 veces mayores para las curvas de 35 y 45 °C y más del triple para la curva de 25 °C (Bruno *et al.*, 2010).

Se realizaron luego ensayos para determinar la fuerza coagulante del EC, buscando la proporción de EC/leche que coagule a 35 °C en 40 min, según la definición de Alais (1984). Se comenzó probando una relación de volúmenes EC/leche de 1:100, que coaguló en menos de 1 min. Se fue disminuyendo la proporción de enzima respecto de la leche y para una relación de volúmenes de 1:1000 el tiempo de coagulación resultó de 8 min. Finalmente se encontró que para la formación de un coágulo en 40 min se requiere una relación de EC/leche de 1:10000, que en este caso se realizó colocando 2,5 µl de EC en 25 ml de leche. Esta fuerza coagulante resultó similar a la hallada para coagular la leche con una dilución de quimosina de 50 IMCU/ml.

Por último, se llevaron a cabo ensayos para estudiar la dependencia del tiempo de coagulación con la concentración de CaCl<sub>2</sub>. Tanto el Ca como el fosfato tienen un rol

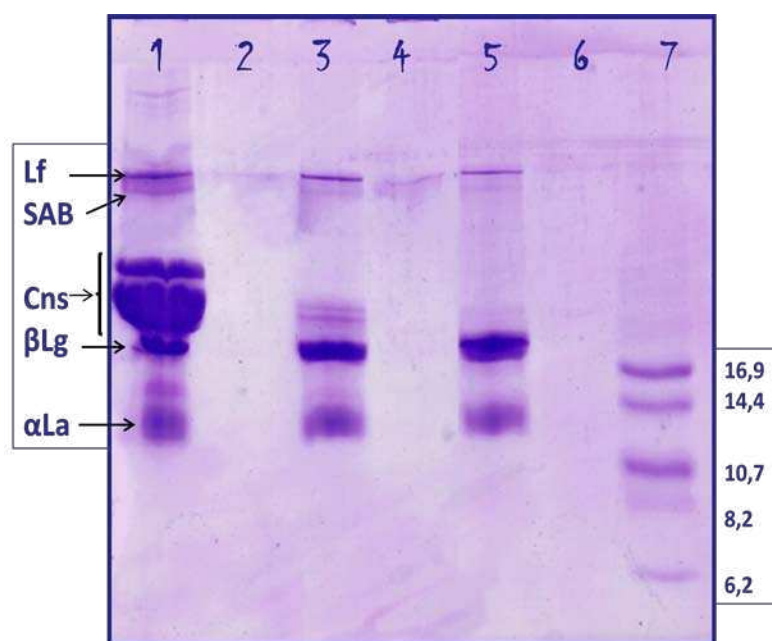
importante en la coagulación de la leche y en la textura con que resulta el queso producido. La adición de Ca reduce el tiempo de coagulación debido a la neutralización de los residuos negativamente cargados presentes en la caseína, lo que aumenta la agregación de las micelas. Además, el añadido de pequeñas concentraciones de Ca proporciona firmeza al gel formado (Lucey & Fox, 1993). En las pruebas realizadas se observó que la actividad coagulante se incrementó significativamente hasta 25 mM de  $\text{CaCl}_2$  y luego siguió aumentando más suavemente hasta los 100 mM (Figura 12). En comparación, para un extracto de *B. hieronymi* (Bruno *et al.*, 2010) y otro de proteasas aspárticas de flores de *Silybum marianum* (Vairo Cavalli *et al.*, 2005) se observa que el efecto coagulante se incrementa hasta una concentración de 25 y 30 mM de  $\text{CaCl}_2$  respectivamente, pero después disminuye. Este comportamiento se relacionaría con un efecto perjudicial causado por el aumento de la fuerza iónica, siendo aparentemente el EC de *M. pomifera* menos sensible al mismo.



**Figura 12.** Efecto de la concentración de  $\text{CaCl}_2$  sobre el tiempo de coagulación de la leche. Los ensayos fueron realizados por triplicado y las barras verticales corresponden al DS.

## 2.2. SDS-PAGE del lactosuero

Los perfiles peptídicos del lactosuero exudado en la coagulación de la leche con EC fueron analizados por SDS-PAGE en geles de tricina (Figura 13). La leche entera (calle 1) presenta el sector de las caseínas (entre 19 y 25 kDa) y las dos bandas correspondientes a las proteínas mayoritarias del suero: la  $\alpha$ -lactoalbúmina (13,4 kDa) y la  $\beta$ -lactoglobulina (19,3 kDa). En el lactosuero de leche coagulada con quimosina (calle 3) y el obtenido con EC (calle 5) se observan las bandas correspondientes a la  $\alpha$ -lactoalbúmina y a la  $\beta$ -lactoglobulina. Otros componentes de mayor PM como la lactoferrina y la seroalbúmina pueden distinguirse en las 3 calles. Por último, la muestra del lactosuero de quimosina muestra 2 bandas de 24,1 y 22,9 kDa que no se observan en el lactosuero de leche coagulada con EC.



**Figura 13.** SDS-PAGE en geles de tricina. **1.** Leche entera (Lf: lactoferrina; SAB: seroalbúmina bovina; Cns: caseínas;  $\beta$ -Lg:  $\beta$ -lactoglobulina;  $\alpha$ -La:  $\alpha$ -lactoalbúmina). **2.** Leche entera filtrada. **3 y 5.** Lactosuero de leche coagulada con quimosina y EC, respectivamente. **4 y 6.** Lactosuero filtrado de leche coagulada con quimosina y EC, respectivamente. **7.** Patrones peptídicos de PM (GE, rango 2,512-16,949 kDa).

En las calles correspondientes a las muestras de lactosuero filtradas con 5 kDa (2, 4 y 6) no se detectó la presencia de bandas peptídicas, lo que significaría que durante la

coagulación no hubo formación masiva de péptidos pequeños por hidrólisis. Otra posibilidad a considerar es que estos péptidos pequeños podrían encontrarse en baja concentración o no entrar dentro del límite de detección de la técnica.

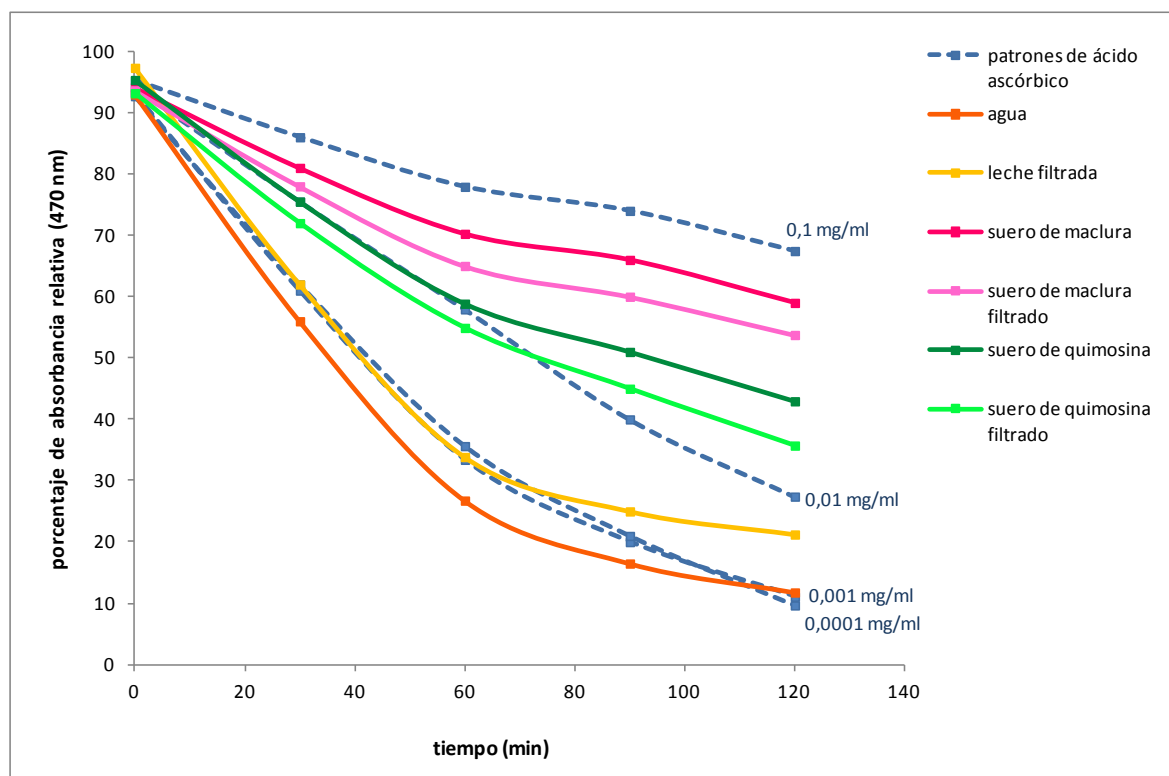
La determinación de la concentración de péptidos (método de Lowry, ver Anexo: Figura D) realizado a las muestras de lactosuero de leche coagulada con EC arrojó valores de  $11,1 \pm 0,7$  mg/ml de proteína para la sin filtrar y  $2,7 \pm 0,3$  mg/ml para la muestra filtrada, es decir que se recuperó un 24% de péptidos en el filtrado respecto del total. Por otra parte, la concentración peptídica en el suero filtrado obtenido con quimosina fue de  $0,5 \pm 0,2$  mg/ml, o sea, 5,4 veces menor que el valor hallado para el suero filtrado obtenido con EC. Por lo tanto, se verifica que hubo una formación de péptidos por acción de las proteasas del EC durante la coagulación de la leche aunque éstos no pudieron ser visualizados por SDS-PAGE.

## 2.3. Determinación de actividades en el suero

### 2.3.1. Actividad antioxidante

En primer lugar, se estudió la actividad antioxidante de los sueros obtenidos de la coagulación de la leche con el EC y con quimosina comercial (tanto aquellos sin filtrar como los filtrados). La Figura 14 muestra las curvas de la decoloración del  $\beta$ -caroteno obtenidas al cabo de 2 h de reacción.





**Figura 14.** Inhibición de la decoloración del  $\beta$ -caroteno para las muestras de suero obtenidas con quimosina y con EC de *M. pomifera* (filtradas y sin filtrar); leche sola filtrada; AD y patrones de ácido ascórbico (0,1 a 0,0001 mg/ml).

Las muestras de suero obtenido coagulando con EC, presentaron curvas que indican una mayor inhibición de la decoloración del  $\beta$ -caroteno que las curvas correspondientes a las muestras de suero obtenido con quimosina (ubicación por debajo de las primeras). Se observa que las 4 curvas de lactosueros se hallan comprendidas entre las de los patrones de ácido ascórbico de 0,01 y 0,1 mg/ml.

Por otro lado, siempre se aprecia una mayor inhibición para las muestras sin filtrar que para las filtradas. Esta inhibición podría atribuirse a la presencia de péptidos antioxidantes producto de la hidrólisis producida por el contacto con las proteasas durante la coagulación y resultaría mayor para las muestras sin filtrar porque éstas incluyen todos los péptidos generados. La curva correspondiente al AD se ubica por debajo de todas las demás, funcionando como control negativo.

En la Tabla 31 se comparan los valores para el porcentaje de actividad antioxidante detectado con el ensayo del  $\beta$ -caroteno con los obtenidos por el método del DPPH.

Muestra	Porcentaje de Actividad antioxidante	
	Método del $\beta$ -caroteno	Método del DPPH
Suero EC	56,7 $\pm$ 0,8	31,6 $\pm$ 3,3
Suero EC filtrado	50,9 $\pm$ 0,6	24,3 $\pm$ 5,8
Suero quimosina	35,5 $\pm$ 3,8	13,2 $\pm$ 4,2
Suero quimosina filtrado	29,3 $\pm$ 2,2	7,9 $\pm$ 3,1

**Tabla 31.** Comparación de la actividad antioxidante de los sueros obtenidos con EC o quimosina, filtrados o sin filtrar. Los valores se expresan como promedio de 3 determinaciones  $\pm$  DS.

Se puede concluir que por ambos métodos, los sueros obtenidos coagulando la leche con quimosina comercial presentaron menores valores de actividad antioxidante que los sueros de leche coagulada con el EC. Por último, se observa que en comparación con el ensayo del  $\beta$ -caroteno, el método del DPPH muestra siempre menores porcentajes de actividad antioxidante para una misma muestra. Esto podría deberse a que en la preparación de las mismas se realiza una precipitación con etanol, lo que causaría la pérdida de parte de los péptidos entre los que se incluirían algunos con poder antioxidante.

### 2.3.2. Actividad inhibitoria de la ECA

Se evaluó la actividad inhibitoria de la ECA de las distintas muestras de lactosuero para verificar la presencia de péptidos que inhiban esta enzima. Para el suero obtenido con el EC se obtuvo una inhibición del  $21 \pm 1 \%$ , mientras que para este mismo filtrado se obtuvo un  $11 \pm 2 \%$ , lo que indicaría que la filtración disminuye 10% el poder de inhibición de la ECA de la muestra. En comparación, en el suero obtenido coagulando la leche con quimosina (tanto filtrado como sin filtrar) no se detectó actividad inhibitoria.

Se procedió luego a concentrar 5 veces (por liofilización y resuspensión en un volumen menor) las muestras de ambos sueros filtrados y se realizó nuevamente el ensayo. En este caso se obtuvo un  $19 \pm 2 \%$  de inhibición para el suero de quimosina y más del doble ( $41 \pm 3 \%$ ) para el obtenido coagulando con el EC.

Finalmente, el valor de  $IC_{50}$  hallado para el suero obtenido con EC fue de 16 mg/ml mientras que para el control de captopril resultó de 0,034  $\mu$ g/ml. Esto indicaría en

principio un bajo poder inhibitorio de la ECA para la muestra de suero, aunque debe tenerse en cuenta que los posibles péptidos responsables de esta actividad se encontrarían en muy baja concentración e inmersos en una muestra compleja, mientras que el captopril es un inhibidor sintético comercial puro.

### 2.3.3. Elección de las caseínas para posteriores análisis

En conclusión, tanto la mayor actividad antioxidante como la mayor actividad inhibitoria de la ECA de los sueros obtenidos de la coagulación de la leche con EC respecto a los obtenidos con quimosina, podrían ser atribuidas a pequeños péptidos producto de la hidrólisis de las proteínas lácteas. Estos péptidos se encontrarían inicialmente encriptados en las secuencias de las proteínas y se liberarían durante la etapa de coagulación, pudiendo provenir tanto del clivaje de las proteínas del suero como de las caseínas. En el presente trabajo se optó por continuar con el análisis de las caseínas, obteniendo hidrolizados en diferentes condiciones y caracterizando los péptidos obtenidos en búsqueda de dichas actividades biológicas.

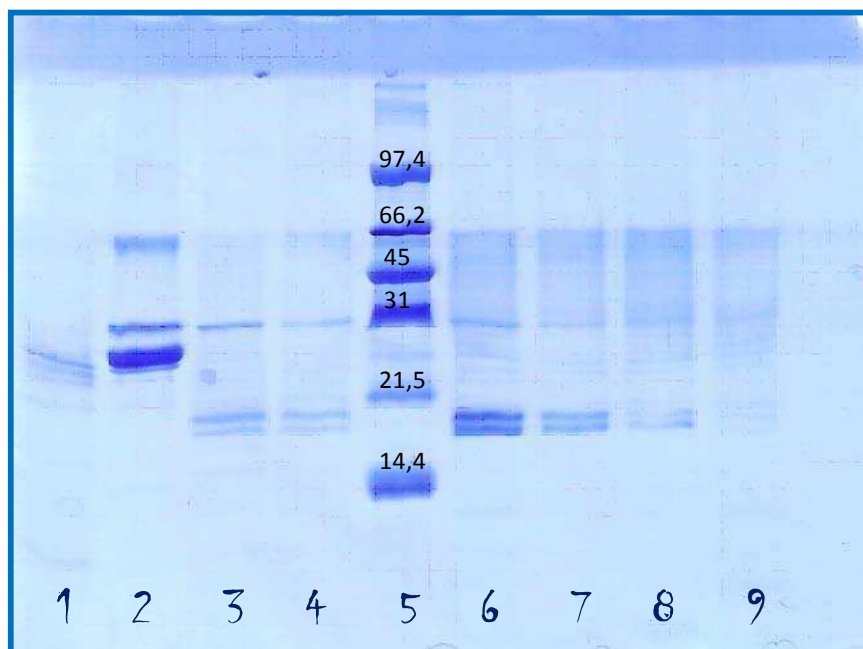
## 3. Obtención y análisis de hidrolizados de caseínas

### 3.1. Preparación de hidrolizados

#### 3.1.1. Determinación de las condiciones de hidrólisis

El PER fue empleado en la obtención de hidrolizados de caseína al 1,25 % p/v a 37 °C. En un primer ensayo se utilizó sin diluir en una relación de volumen de 1:9 con respecto a la caseína. La Figura 15 muestra el SDS-PAGE en geles de tricina, donde se sembraron muestras de estos hidrolizados. Se puede observar que la caseína se degradó totalmente

en todos los tiempos de hidrólisis, hasta llegar a formarse 2 bandas proteicas persistentes de 18,0 y 19,8 kDa.



**Figura 15.** SDS-PAGE en geles de tricina de los hidrolizados. Calles: **1.** Blanco de enzima. **2, 3, 4, 6, 7, 8 y 9.** Hidrolizados de 0, 5 , 10, 30, 60, 90 y 180 min, respectivamente. **5.** Patrones de PM (Bio-Rad, Low Range, expresados en kDa).

### 3.1.2. Análisis por MALDI-TOF

Se obtuvo la huella peptídica (PMF) por hidrólisis tríptica y análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF, de las 2 bandas persistentes (18,0 y 19,8 kDa, Figuras 16 y 17, respectivamente). Mediante el uso de la herramienta Mascot disponible en el sitio web Matrix Science (<http://www.matrixscience.com>), se identificaron los péptidos de estas bandas como pertenecientes a la  $\alpha_{s2}$ -caseína, con una puntuación (score) de 75 para la de 19,8 kDa y de 66 para la de 18,0 kDa. El programa calcula el score para una proteína como  $-10 \cdot \log(P)$ , donde P es la probabilidad de que la coincidencia sea al azar, considerando como valores significativos ( $p < 0,05$ ) aquellos mayores a 61.

Estos resultados revelarían una preferencia de la enzima por ciertos enlaces peptídicos, ya que deja prácticamente sin degradar 2 fragmentos grandes de la  $\alpha_{s2}$ -

caseína, mientras que las otras caseínas son hidrolizadas ya en los primeros min de reacción.

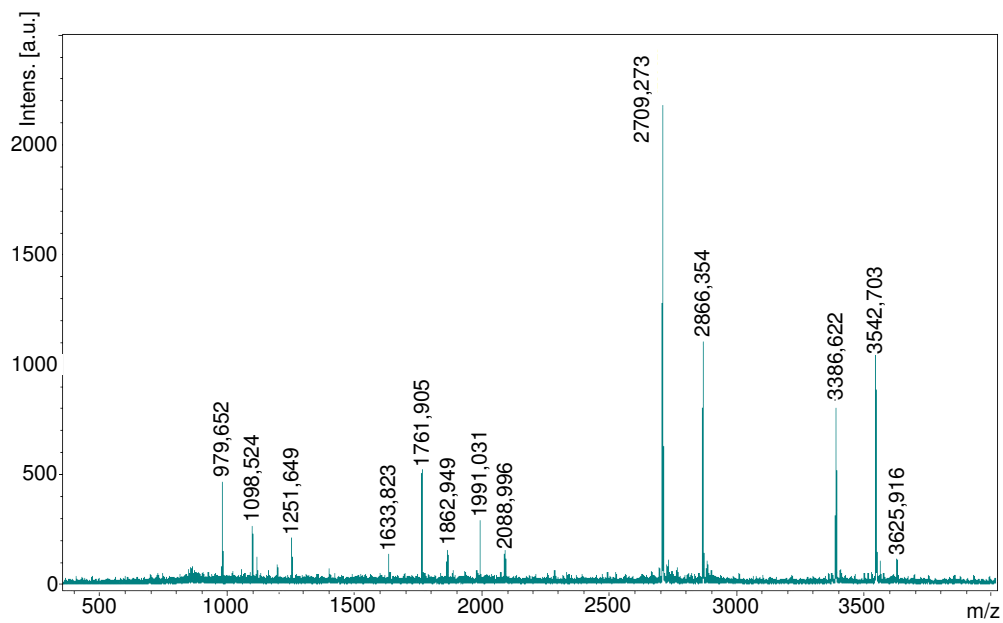


Figura 16. Espectro de masas de la banda de 18,0 kDa.

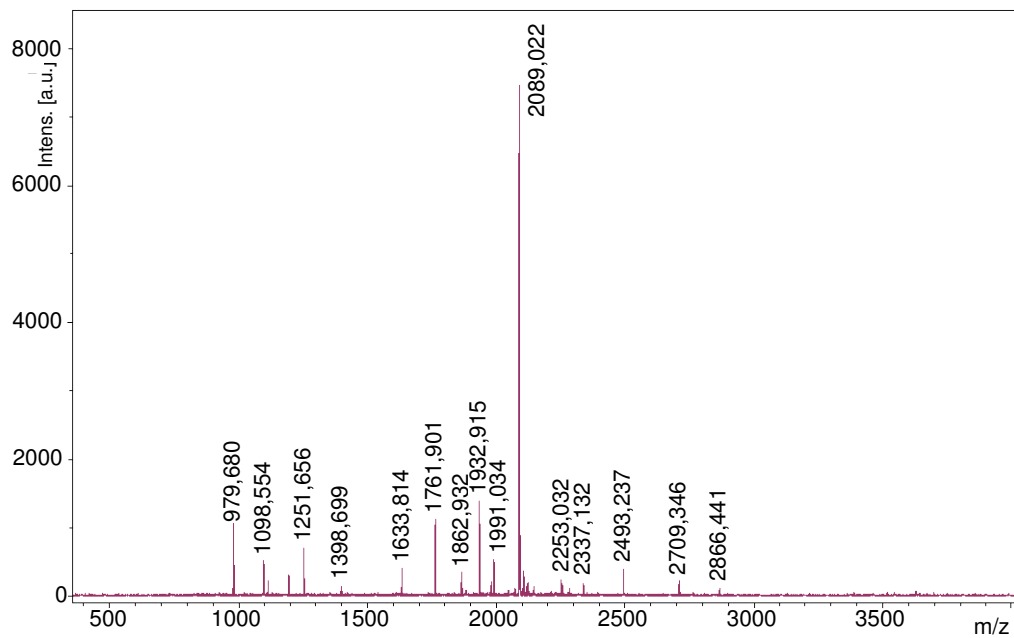
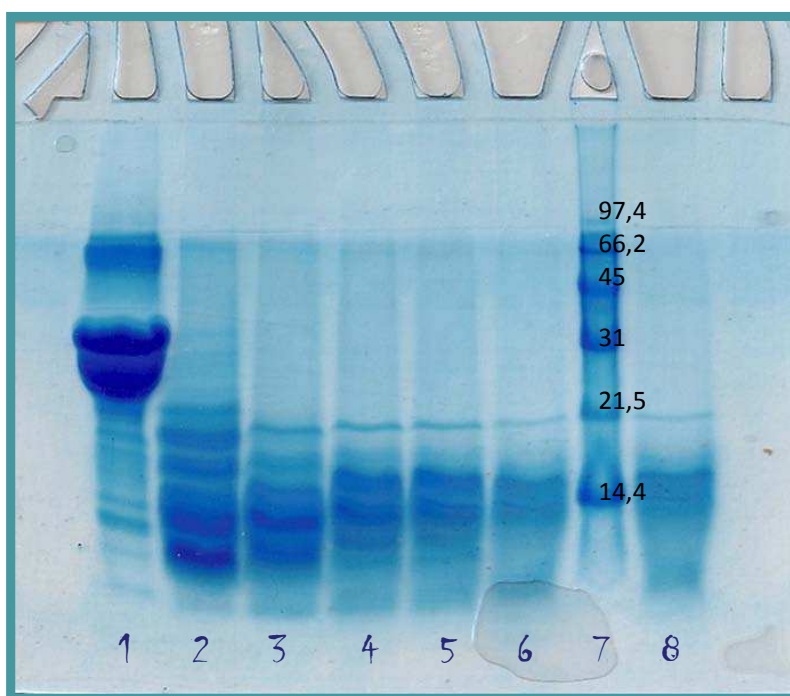


Figura 17. Espectro de masas de la banda de 19,8 kDa.

## 3.2. Modificación de las condiciones de hidrólisis

### 3.2.1. Seguimiento por SDS-PAGE

Con la finalidad de aumentar la degradación y poder cortar los péptidos persistentes de 18,0 y 19,8 kDa se elevó la temperatura de reacción a 45 °C. Como la hidrólisis en estas condiciones resultó ser masiva, para poder apreciar el patrón de degradación de las caseínas de manera continua se realizaron diluciones del PER de 1:5, 1:10, 1:50 y 1:100 en AD. En un principio las reacciones fueron detenidas empleando ácido tricloroacético (TCA) al 5% p/v. Como resultaba importante evitar la toxicidad en los hidrolizados ya que se estudian para posibles aplicaciones en alimentos, posteriormente se seleccionó un tratamiento térmico de 10 min a 100°C. La Figura 18 muestra el SDS-PAGE de los hidrolizados obtenidos empleando la dilución enzimática de 1:5.



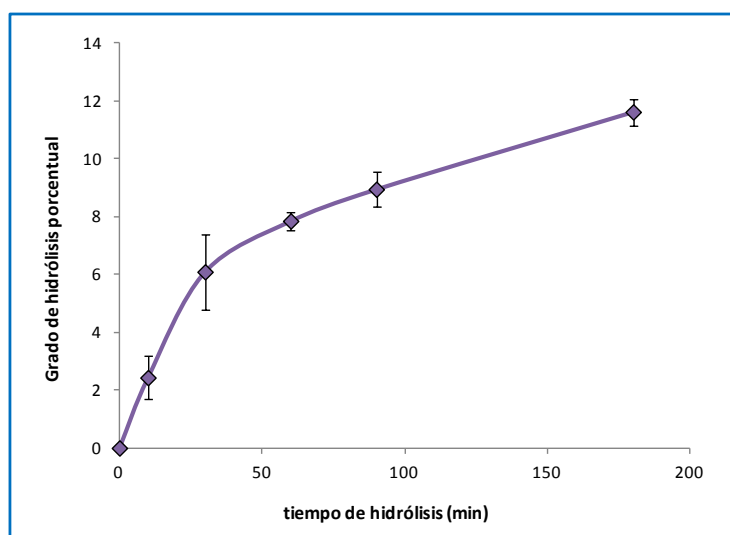
**Figura 18.** SDS-PAGE en geles de tricina de los hidrolizados. Calles: **1, 2, 3, 4, 5, 6 y 8.** Hidrolizados de 0, 10, 30, 60, 90, 180 min, 180 min duplicado. **7.** Patrones de PM (Bio-Rad, Low Range, en kDa).

Se obtuvo un patrón de degradación creciente donde a los 10 min ya no se aprecian las caseínas y aparecen las bandas de 18,0 y 19,8 kDa y otras de aproximadamente 22,5;

13,5 y 10,4 kDa. A los 30 min persisten las bandas de 18,0; 13,5 y 10,4 kDa, formándose una adicional de 20,7 kDa. A partir de los 60 min de hidrólisis el patrón de bandas parece permanecer constante: desaparece definitivamente la banda de 18,0 kDa, persiste la de 20,7 kDa y se visualizan 2 nuevas de 13,0 y 16,0 kDa.

### 3.2.2. Determinación del grado de hidrólisis y de la concentración peptídica

A continuación se determinó el grado de hidrólisis de estos hidrolizados por el método del TNBS (curva de calibración: ver Anexo, Figura E). En la Figura 19 se grafican los resultados para los porcentajes de hidrólisis obtenidos.



**Figura 19.** Grado de hidrólisis en función del tiempo. Los valores se expresan como promedio de 3 determinaciones  $\pm$  DS.

Pudo verse que el aumento en el grado de hidrólisis en función del tiempo de reacción resultó más pronunciado hasta aproximadamente los 30 min de proteólisis. Esto concuerda con lo observado en la electroforesis: sería en este tiempo cuando las proteasas clivaron de manera masiva una gran parte de los enlaces peptídicos y luego la hidrólisis continuó más lentamente. En la Tabla 32 se detallan los valores calculados para el grado de hidrólisis a cada uno de los distintos tiempos.

Tiempo de hidrólisis	Grado de hidrólisis
10 min	2,4 ± 0,8
30 min	6,1 ± 1,3
60 min	7,9 ± 0,3
90 min	9,0 ± 0,6
180 min	11,6 ± 0,5

**Tabla 32.** Cálculo del grado de hidrólisis para los hidrolizados. Los valores se expresan como promedio de 3 determinaciones ± DS.

Los hidrolizados fueron luego filtrados con tubos Falcon Millipore de 3 kDa de corte con el objetivo de seleccionar los péptidos más pequeños. En la Tabla 33 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de Lowry para la determinación de la concentración peptídica (curva de calibración: ver Anexo, Figura F).

Tiempo de hidrólisis (min)	Concentración de los hidrolizados filtrados (mg/ml)
0	no detectable
10	0,81 ± 0,21
30	0,82 ± 0,05
60	1,59 ± 0,02
90	1,57 ± 0,08
180	1,80 ± 0,04

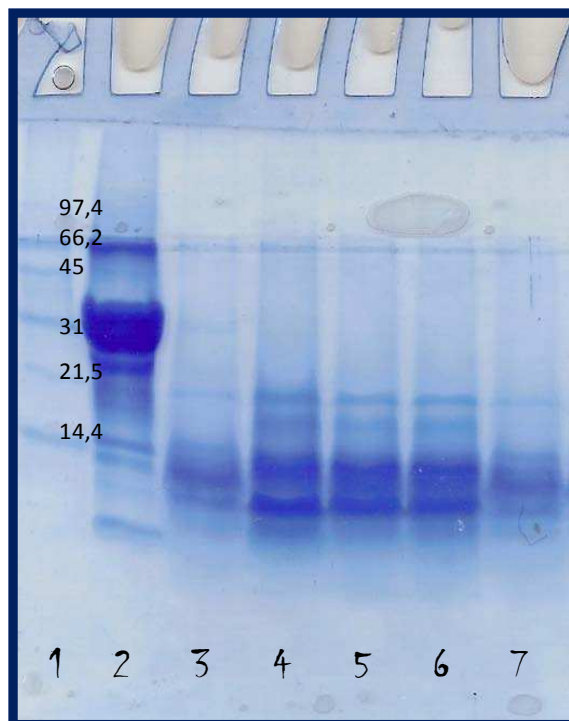
**Tabla 33.** Concentración de péptidos detectada en los hidrolizados filtrados. Las muestras se diluyeron 1:5 y los valores se expresaron como promedio de 3 ó 5 determinaciones ± DS.

Pudo notarse que con el tiempo de hidrólisis aumenta la concentración de péptidos en el filtrado, hecho que concuerda con la idea de que se van liberando nuevos péptidos de masas moleculares menores a 3 kDa los cuales logran pasar a través del filtro.

### 3.2.3. Verificación de la reproducibilidad en la obtención de hidrolizados

Se realizó posteriormente un segundo stock de hidrolizados bajo las mismas condiciones. La electroforesis correspondiente se muestra en la Figura 20.



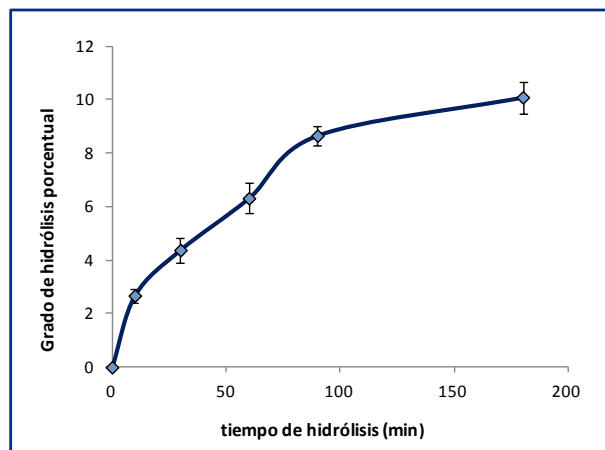


**Figura 20.** Electroforesis en gel de poliacrilamida del segundo stock de hidrolizados. Calles: **1.** Patrones de PM (Bio-Rad, Low Range, en kDa). **2, 3, 4, 5, 6 y 7.** Hidrolizados de 0, 180, 10, 30, 60 y 90 min.

En este caso, se observó un patrón de degradación ligeramente diferente. Desde los 10 hasta los 60 min de hidrólisis ya no se aprecian las caseínas y se observan tanto las bandas de 18,0 y 19,8 kDa como las de 13,0 y 16,0 kDa. A partir de los 90 min se visualizan las bandas de 19,8 y 16 kDa mucho más tenues, mientras que desaparece la de 18,0 y se forma una nueva de aproximadamente 14,0 kDa. La Tabla 34 muestra los valores calculados para el grado de hidrólisis alcanzado a cada uno de los tiempos por el método del TNBS y la Figura 21 el gráfico correspondiente. (Curva de calibración: ver Anexo, Figura G).

Tiempo de hidrólisis	Grado de hidrólisis
10 min	2,7 ± 0,3
30 min	4,4 ± 0,5
60 min	6,3 ± 0,6
90 min	8,7 ± 0,4
180 min	10,1 ± 0,6

**Tabla 34.** Cálculo del grado de hidrólisis para los hidrolizados. Los valores se expresan como promedio de 3 determinaciones ± DS.



**Figura 21.** Grado de hidrólisis en función del tiempo.

Finalmente se determinó la concentración peptídica por el método de Lowry para cada uno de los hidrolizados filtrados con membrana de 3 kDa. En la Tabla 35 se muestran los valores hallados (curva de calibración, ver Anexo Figura H).

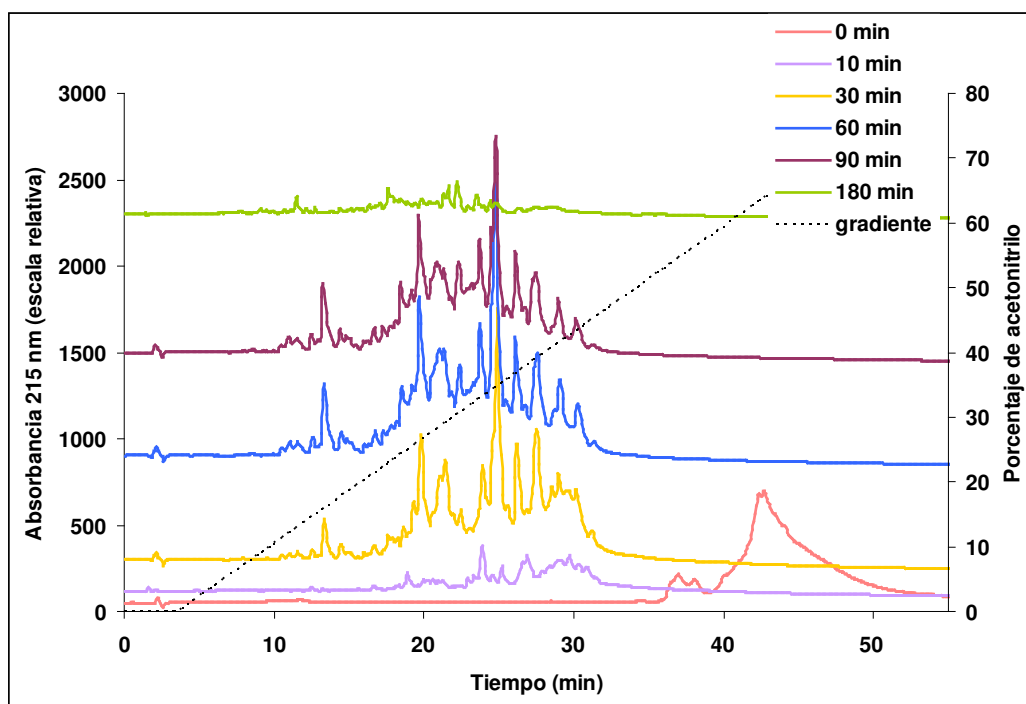
Tiempo de hidrólisis (min)	Concentración de los hidrolizados filtrados (mg/ml)
0	0,02 ± 0,01
10	0,53 ± 0,02
30	0,98 ± 0,01
90	1,08 ± 0,07
180	1,63 ± 0,03

**Tabla 35.** Concentración de péptidos detectada en los hidrolizados filtrados. Las muestras se diluyeron 1:5 y los valores se expresaron como promedio de 3 ó 5 determinaciones ± DS.

Puede observarse en este caso que tanto el patrón de bandas electroforéticas como el grado de hidrólisis, muestran que la proteólisis fue ligeramente menor, obteniéndose también una menor concentración de péptidos en el hidrolizado de 180 min. Esta diferencia, podría atribuirse a que el EC empleado para obtener el PER llevaba unos meses de almacenamiento a -20 °C y por lo tanto su actividad enzimática se habría visto disminuida.

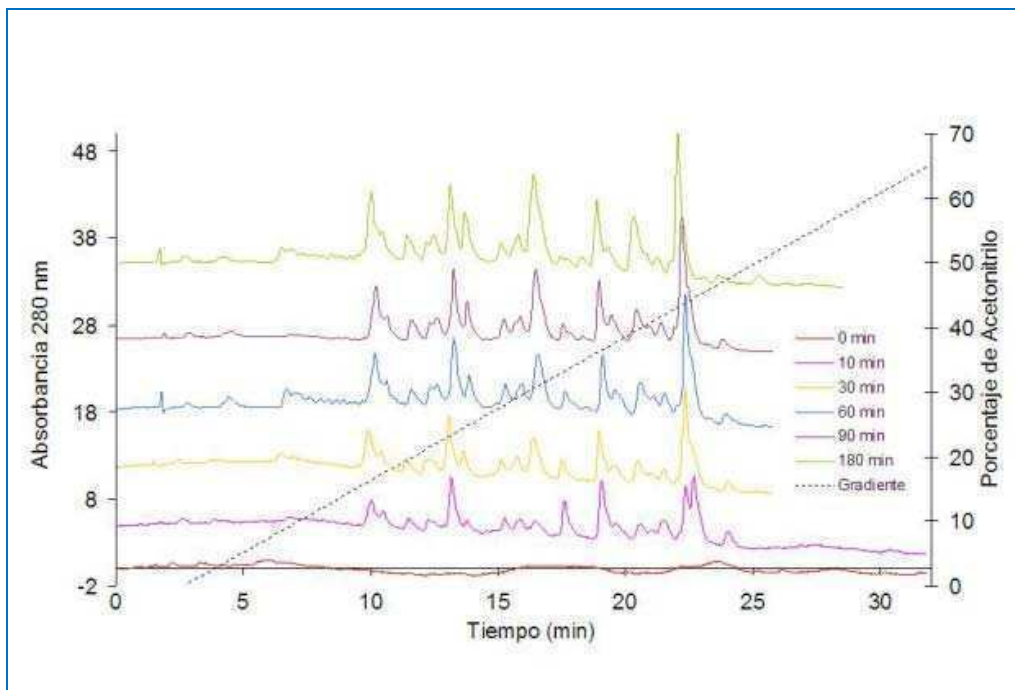
### 3.3. Análisis de los hidrolizados por RP- HPLC y espectrometría de masas

Todos los hidrolizados fueron analizados por cromatografía en fase reversa. La Figura 22 presenta los cromatogramas obtenidos a partir de los hidrolizados sin filtrar. Se observa en la curva de tiempo 0 min un pico mayoritario (donde se encontrarían las caseínas), que desaparece a los 10 min de hidrólisis dando lugar a los diversos picos correspondientes a los péptidos producto de la proteólisis. Se puede apreciar que el perfil peptídico se estabiliza mostrando picos prácticamente constantes en el tiempo.

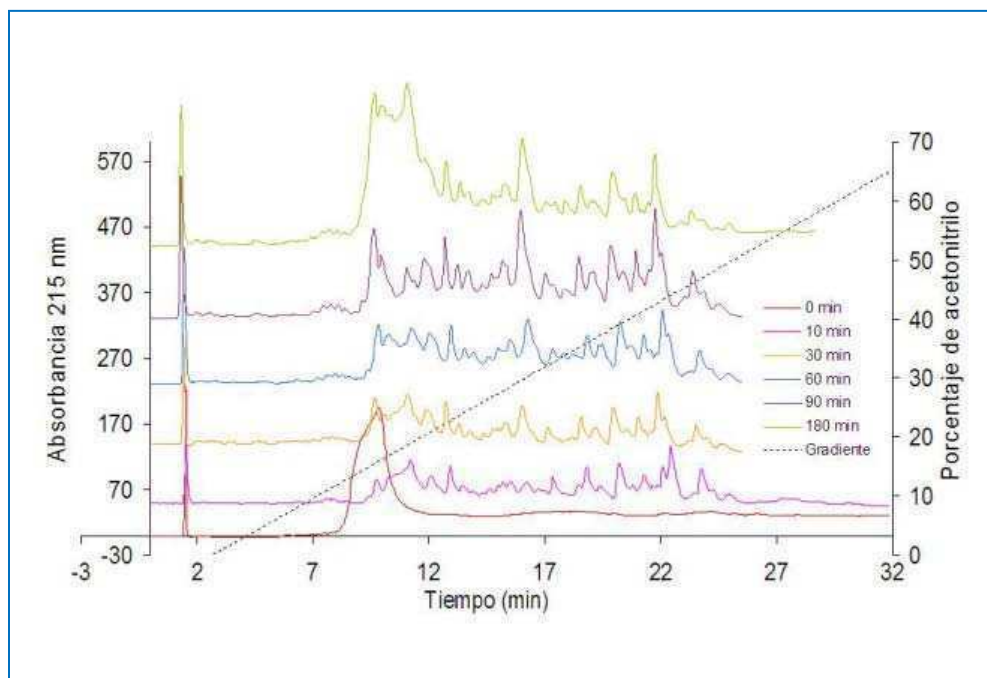


**Figura 22.** Cromatografía en fase reversa de los hidrolizados de caseína sin filtrar detectados a 215 nm. Columna Phenomenex Bondclone 10 C18. Gradiente de agua-TFA/ acetonitrilo-TFA de 0 a 100%.

Los hidrolizados filtrados con membrana de 3 kDa presentaron a 280 y 215 nm los perfiles que se muestran en las Figuras 23 y 24 respectivamente.



**Figura 23.** Cromatografía en fase reversa de los hidrolizados de caseína filtrados detectados a 280 nm. La escala graficada es relativa. Columna Phenomenex Bondclone 10 C18. Gradiente de agua-TFA/ acetonitrilo-TFA de 0 a 100%.



**Figura 24.** Cromatografía en fase reversa de los hidrolizados de caseína filtrados detectados a 215 nm. La escala graficada es relativa. Columna Phenomenex Bondclone 10 C18. Gradiente de agua-TFA/ acetonitrilo-TFA de 0 a 100%.

A 215 nm (Figura 24) puede detectarse en el tiempo 0 un pico mayoritario que desaparece a los 10 min de hidrólisis. Luego el patrón de picos se mantiene. En el caso de la absorbancia a 280 nm (Figura 23) puede verse en todos los tiempos un patrón similar con 6 picos predominantes. Esto indicaría una vez más que la enzima escinde todos los sitios posibles en los primeros min de hidrólisis y con el tiempo no se observan diferencias significativas en el perfil peptídico resultante.

## 4. Búsqueda de actividad antioxidante en los hidrolizados

No se detectó actividad antioxidante por el método del DPPH en los hidrolizados filtrados, mientras que los valores obtenidos para soluciones de ácido ascórbico de 0,1 y 0,01 mg/ml fueron de  $94 \pm 1,1 \%$  y  $17 \pm 1,2 \%$ , respectivamente. Por otro lado, los resultados obtenidos para las muestras de hidrolizados sin filtrar se consignan en la Tabla 36.

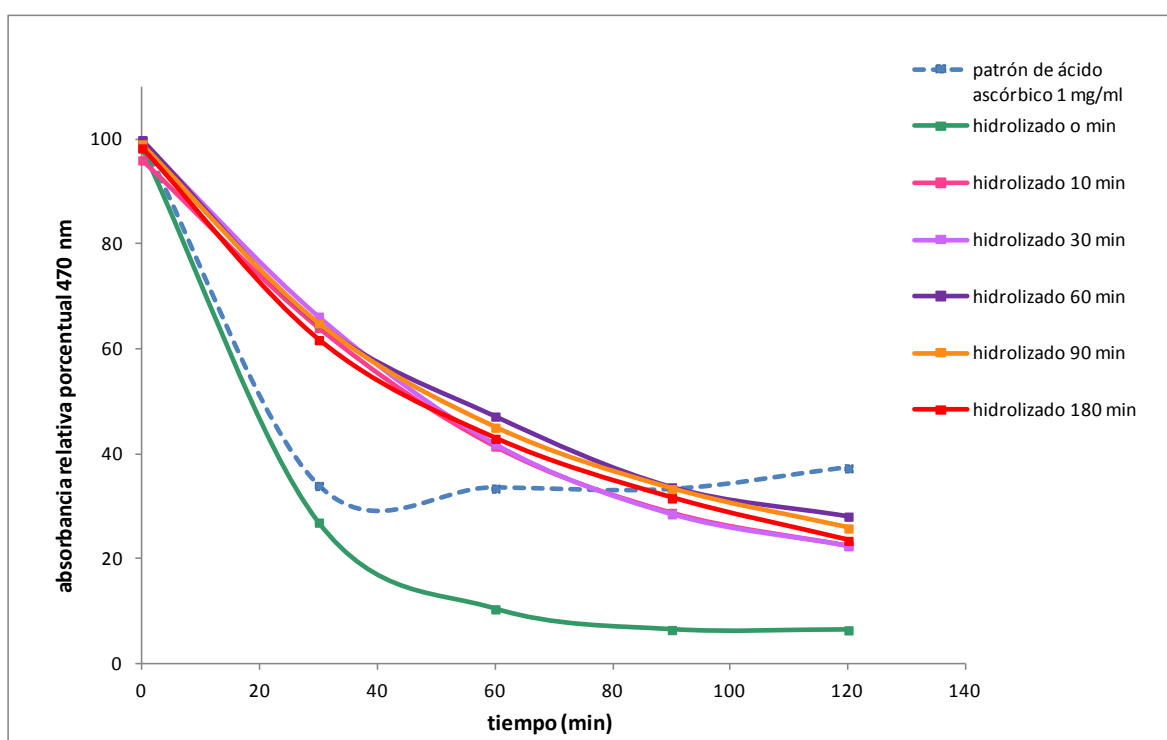
Hidrolizados sin filtrar	Porcentaje de Actividad antioxidante
0 min	no detectable
10 min	no detectable
30 min	$11,18 \pm 0,29$
60 min	$9,76 \pm 0,83$
90 min	$12,93 \pm 0,17$
180 min	$11,24 \pm 0,64$

**Tabla 36.** Comparación de los valores de actividad antioxidante para los hidrolizados por el método del DPPH. Los valores se expresaron como promedio de 3 determinaciones  $\pm$  DS.

Aparentemente todos los hidrolizados, excepto el de 10 min, presentan valores similares de actividad antioxidante.

A continuación se ensayaron las muestras filtradas por el método de la inhibición de la decoloración del  $\beta$ -caroteno (Figura 25). De manera cualitativa, se observa un

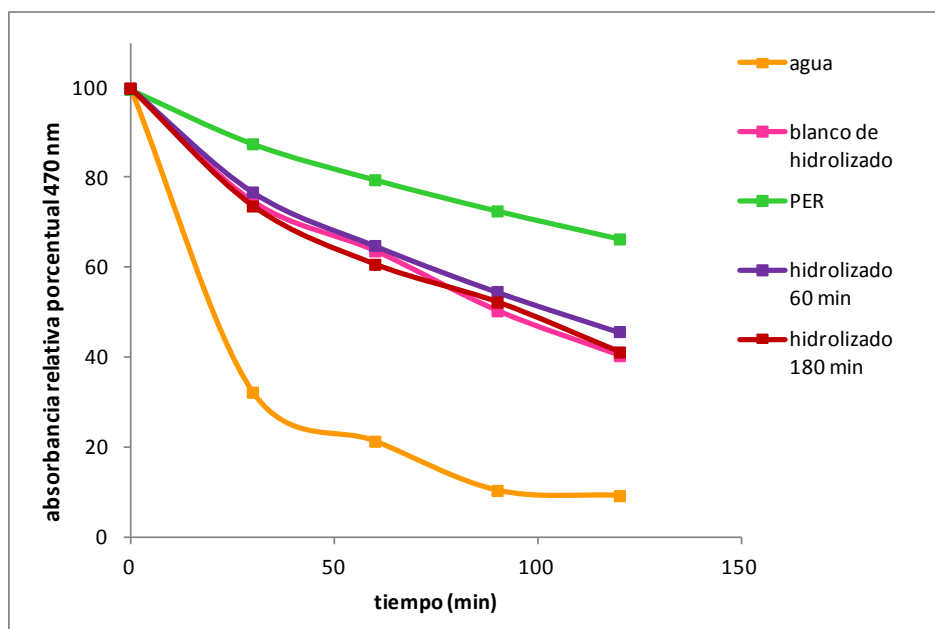
comportamiento muy similar para los diferentes hidrolizados inclusive el de 10 min, que había resultado no detectable por el método del DPPH. El control de tiempo 0 min presenta una curva que resultó muy por debajo de todas las demás. Este hecho indicaría que el compuesto responsable de la actividad antioxidante observada en las curvas correspondientes a todos los tiempos de hidrólisis sería un péptido proveniente de la hidrólisis de las caseínas, o bien algún componente del PER. El control con ácido ascórbico (1 mg/ml) presentó la mayor inhibición de la decoloración.



**Figura 25.** Curvas obtenidas del ensayo de la inhibición de la decoloración del  $\beta$ -caroteno para los distintos hidrolizados y un patrón de ácido ascórbico de 1 mg/ml.

Con el fin de determinar si la actividad antioxidante se debía a algún péptido producto de la hidrólisis o a algún componente del PER, se llevó a cabo un segundo ensayo donde se analizaron nuevamente las muestras de 60 y 180 min junto a un control de PER diluido 1:5 y a un blanco de hidrolizado (en todos los casos, filtradas con 3kDa). Este último fue realizado tratando por separado el PER y el sustrato caseína comercial 10 min a ebullición, que luego se juntaron e incubaron a 45 °C. Las enzimas en esta muestra

se encontrarían autodegradadas e inactivadas totalmente y la hidrólisis de la caseína sería nula. La Figura 26 muestra el gráfico correspondiente.



**Figura 26.** Ensayo de la inhibición de la decoloración del  $\beta$ -caroteno para las muestras de hidrolizado filtradas de 60 y 180 min, blanco de hidrolizado filtrado, PER diluido 1:5 filtrado y AD.

Se corrobora que las curvas de inhibición de la decoloración del  $\beta$ -caroteno para los hidrolizados de 60 y 180 min son muy parecidas y se observa un comportamiento similar para el blanco de hidrolizado, lo que indica que no habría aumento en la actividad antioxidante debido a la hidrólisis. El comportamiento del AD es esperable, ya que la curva se ubica muy por debajo de las demás. Un comportamiento menos esperado fue el observado para la dilución 1:5 del PER, donde se aprecia una mayor actividad antioxidante que en el resto de las muestras.

En la Tabla 37 se presentan los valores de actividad antioxidante a los 120 min de reacción. El análisis de varianza confirma que existen diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre algunos pares de valores. La prueba HSD de Tukey demuestra que no hay diferencias significativas ( $p > 0,01$ ) entre los hidrolizados de 60 min ( $46,0 \pm 3,4$ ), 180 min ( $42,3 \pm 2,0$ ) y el blanco de hidrolizado ( $39,8 \pm 6,2$ ). Por otra parte se verifica la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre la dilución 1:5 del PER ( $63,7 \pm 1,2$ ) y el resto de las muestras.

Estos resultados estarían indicando que sería algún componente del PER el responsable de la actividad antioxidante. Debe tenerse en cuenta que se analizó una muestra de PER diluida 1:5, mientras que en las muestras de hidrolizados la dilución final resulta de 1:20. Esto explicaría por qué la curva del PER queda muy por encima de las correspondientes al blanco de hidrolizado e hidrolizados de 60 y 180 min.

Muestras	Porcentaje de Actividad antioxidante
hidrolizado de 60 min	46,0 ± 3,4 <sup>a</sup>
hidrolizado de 180 min	42,3 ± 2,0 <sup>a</sup>
blanco de hidrolizado	39,8 ± 6,2 <sup>a</sup>
PER diluido 1:5	63,7 ± 1,2 <sup>b</sup>

**Tabla 37.** Comparación de los porcentajes de actividad antioxidante. Los valores se expresaron como promedio de 3 determinaciones ± DS. Cada par de datos con la misma letra indica que la diferencia entre ellos no es significativa ( $p > 0,01$ ).

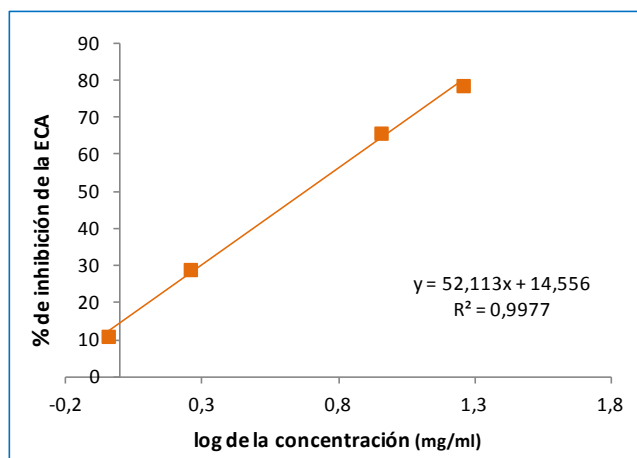
## 5. Búsqueda e identificación de péptidos con actividad inhibitoria de la ECA

### 5.1. Determinación del poder de inhibición de la ECA de los hidrolizados

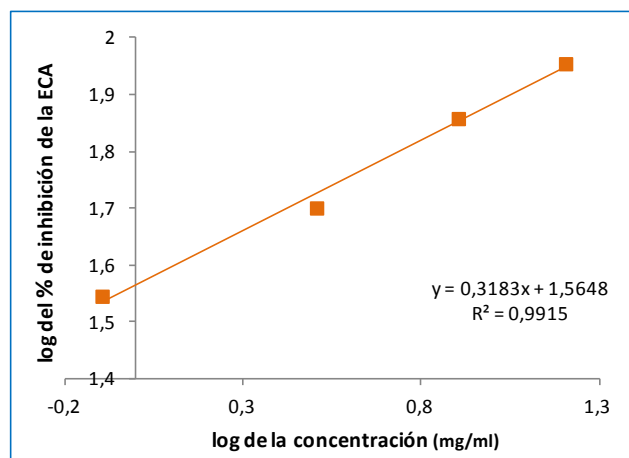
En primer lugar se ensayaron todos los hidrolizados con el fin de detectar la presencia de actividad inhibitoria de la ECA y comparar los resultados para los distintos tiempos de hidrólisis. Los máximos valores fueron hallados en los hidrolizados de 180 min ( $91,2 \pm 0,3$  %) y de 60 min ( $86,4 \pm 0,2$  %). Para determinar las  $IC_{50}$  se procedió a concentrar ambas muestras por liofilización y resuspensión en diferentes volúmenes de agua bidestilada, obteniéndose 4 concentraciones diferentes respecto de la muestra original. Las Figuras 27 y 28 muestran la actividad inhibitoria de la ECA en función de la concentración de los hidrolizados, empleando escala semilogarítmica para el de 60 min y



logarítmica para el de 180 min. Los valores de  $IC_{50}$  resultaron de  $2,6 \pm 0,3$  y  $4,8 \pm 0,4$  mg/ml, respectivamente.



**Figura 27.** Curva para la determinación de la  $IC_{50}$  del hidrolizado de 60 min.



**Figura 28.** Curva para la determinación de la  $IC_{50}$  del hidrolizado de 180 min.

Estos valores resultaron ser del mismo orden que los reportados por otros autores para hidrolizados totales. Por ejemplo, Wu *et al.* (2012) obtuvo una  $IC_{50}$  de 2,36 mg/ml para un hidrolizado de  $\alpha$ -caseína obtenido con una proteinasa de la envoltura celular de *Lactobacillus casei*; mientras que los péptidos purificados mostraron valores inferiores a 1 mg/ml. Inhibidores comerciales puros como el captopril presentan valores mucho más pequeños (0,034  $\mu$ g/ml, determinado en el ítem 2.3.2).

## 5.2. Identificación de posibles péptidos responsables de la actividad inhibitoria de la ECA

En vista de lo expuesto, se eligieron los hidrolizados de 60 y 180 min para realizar un análisis por espectrometría de masas (Figuras 29 y 30). El perfil obtenido es muy similar para ambos tiempos de hidrólisis, lo que resulta concordante con lo observado en las cromatografías (Figuras 23 y 24) y por lo tanto se deduce que la hidrólisis no se incrementaría significativamente por encima de los 60 min. Por otra parte, a diferencia de los cromatogramas donde no se observó una fracción mayoritaria, los espectros de masas mostraron un pico claramente más abundante de 1880,963 Da para el hidrolizado de 60

min y 1880,972 Da para el de 180 min. Dada la pequeña diferencia de masas entre ambos (0,009 Da) se trataría del mismo péptido.

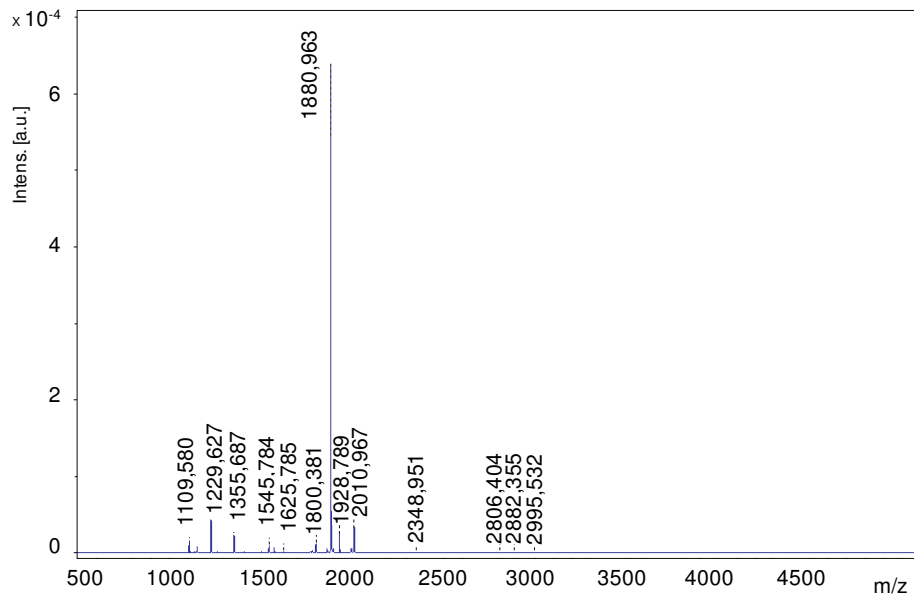


Figura 29. Espectro de masas MALDI-TOF de los hidrolizados de caseína filtrados de 60 min.

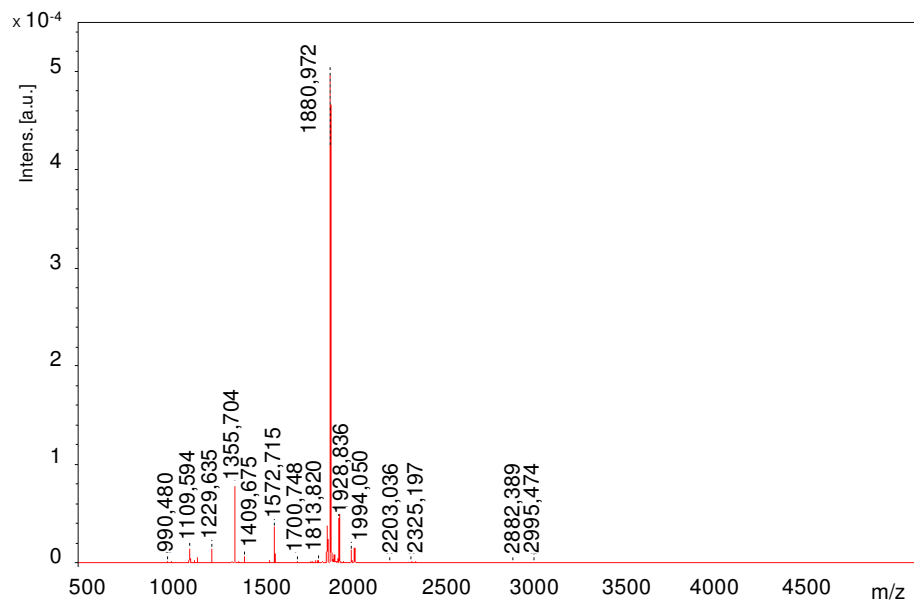


Figura 30. Espectro de masas MALDI-TOF de los hidrolizados de caseína filtrados de 180 min.

A continuación, se utilizó la herramienta FindPept (disponible en [www.expasy.org](http://www.expasy.org)) que permite identificar péptidos que resultan del clivaje inespecífico de proteínas por medio de los valores experimentales de sus masas. De esta manera se compararon los listados de masas obtenidos por MALDI-TOF con la secuencia peptídica de cada una de las caseínas bovinas (disponibles en la base de datos UniProt, [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Se analizó el pico mayoritario de ambos hidrolizados (1880,972-1880,963 Da) y las coincidencias encontradas proporcionaron las posibles secuencias peptídicas, obteniéndose 2 pertenecientes a la  $\alpha_{S1}$ -caseína (**f**<sub>103-117</sub>, SERYLGYLEQLRLK; **f**<sub>34-49</sub>, NLLRFFVAPFPEVFGK) y una proveniente del extremo C terminal de la  $\beta$ -caseína (**f**<sub>208-224</sub>, YQEPVLGPVRGPFPIIV). Los datos fueron analizados con un  $\Delta\text{masa} \leq 0,1$  en todos los casos ( $\Delta\text{masa}$ : diferencia entre la masa calculada de cada péptido teórico y la masa experimental obtenida por MALDI-TOF). Si bien en los SDS-PAGE (Figuras 15, 18 y 20) se observaban perfiles de hidrólisis constantes y con algunas bandas muy persistentes, con los datos de las secuencias teóricas no se pudo deducir algún sitio específico de corte, ya que los posibles péptidos mostraron una gran heterogeneidad en los aminoácidos de sus extremos.

Posteriormente se realizaron alineamientos de las posibles secuencias aminoacídicas obtenidas, con péptidos inhibitorios de la ECA provenientes de caseínas bovinas presentes en la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>). De esta manera, se encontró que dentro de las secuencias NLLRFFVAPFPEVFGK y YQEPVLGPVRGPFPIIV están contenidas las de varios péptidos más pequeños inhibidores de la ECA. En las Tablas 38 y 39 se muestran aquellos biopéptidos para los cuales el solapamiento con las secuencias ocurre en el extremo C-terminal. Estas coincidencias resultan ser las de mayor interés ya que el poder inhibitorio de la ECA de un péptido se encuentra fuertemente determinado por los aminoácidos presentes en su extremo C-terminal (Hernández-Ledesma *et al*, 2011).

Alineación de secuencias		
	NLLRFFVAPFPEVFGK	ID
1	FGK	3377
2	FPEVFGK	7496
3	FFVAPFPEVFGK	7800

**Tabla 38.** Alineamiento de la secuencia proveniente de la  $\alpha_{S1}$ -caseína con péptidos inhibitorios de la ECA de la base BIOPEP. Se indica el número de identificación (ID) en cada caso.

Alineación de secuencias		
	YQEPVLGPVRGPFPIIV	ID
1	VRGPFPIIV	7566
2	GPFPIIV	8159
3	RGPFPIIV	8160
4	GPVRGPFPII	8169

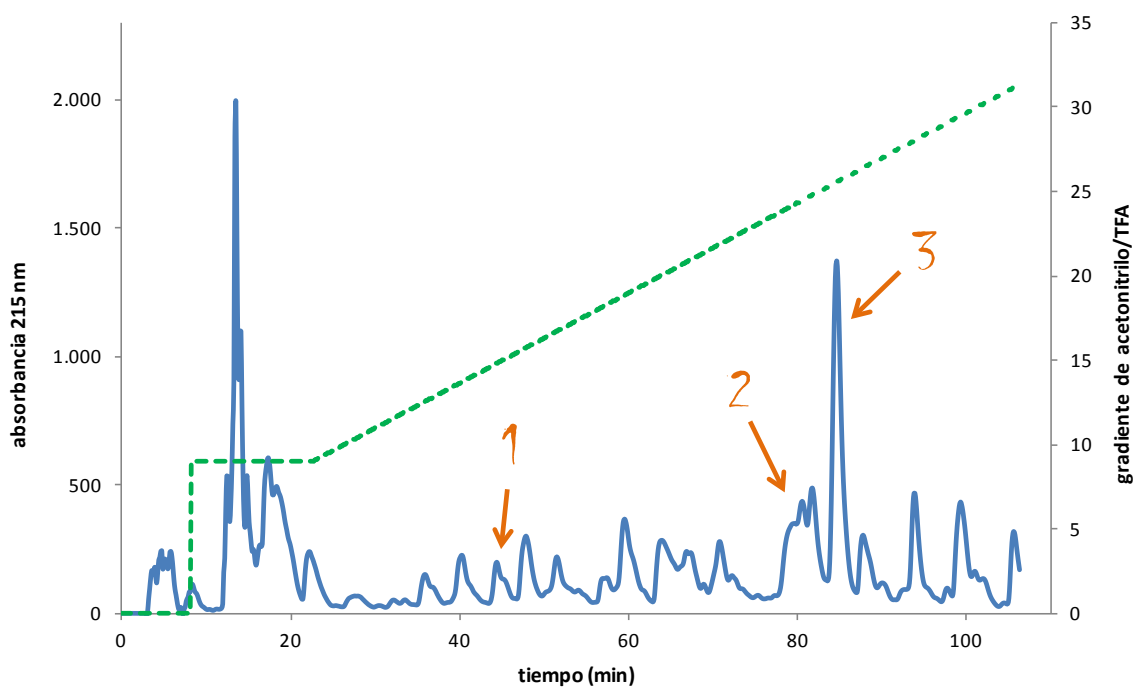
**Tabla 39.** Alineamiento de la secuencia proveniente de la  $\beta$ -caseína con péptidos inhibitorios de la ECA de la base BIOPEP. Se indica el número de identificación (ID) en cada caso.

Se ha reportado la preferencia de la ECA por sustratos e inhibidores que contienen aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos o de cadena ramificada) en el tripéptido C-terminal. Además se ha observado que la presencia de leucina en dicho tripéptido incrementa el potencial inhibitorio de la ECA y que la isoleucina y la valina predominan en los péptidos con mayor actividad inhibitoria (López-Fandiño *et al.*, 2006; Erdmann *et al.*, 2008; Hernández-Ledesma *et al.*, 2011). Estas características se observan en los péptidos mostrados en la Tabla 39 (secuencia C-terminal: IIV). Por otra parte, la presencia de lisina o arginina en el extremo C-terminal también contribuye, debido a la carga positiva, a incrementar el potencial inhibitorio de la ECA (López-Fandiño *et al.*, 2006; Hernández-Ledesma *et al.*, 2011), siendo este el caso de los péptidos de la Tabla 38.

Por último, la secuencia peptídica YQEPVLGPVRGPFPIIV (Tabla 39) fue previamente identificada y estudiada en diferentes quesos (Lignitto *et al.*, 2009). Ong y colaboradores (2007) aislaron péptidos inhibidores de la ECA de un queso Cheddar adicionado con *Lactobacillus casei*. Luego de 24 semanas de maduración la  $IC_{50}$  de un extracto soluble del queso resultó de 0,28 mg/ml y la del péptido purificado de 0,14 mg/ml. Si se comparan estos valores con los obtenidos para los hidrolizados de caseínas de 60 y 180 min, se observa que sólo son de un orden de magnitud menor. Debe considerarse que los hidrolizados totales constituyen muestras complejas donde cada péptido se encuentra en baja concentración.

### 5.3. Purificación de péptidos por HPLC

El hidrolizado de 180 min fue analizado por RP-HPLC empleando un gradiente menos pronunciado que el de las corridas anteriores con la finalidad de obtener una mayor resolución de los péptidos y poder profundizar en la identificación de los mismos (Figura 31). De esta manera se obtuvieron picos más definidos, que fueron colectados para determinar actividad inhibitoria de la ECA. En el cromatograma se señalan aquellas fracciones para las que se obtuvieron los mayores valores de actividad inhibitoria, consignados en la Tabla 40 e identificados con su tiempo de retención.



**Figura 31.** Cromatografía en fase reversa del hidrolizado filtrado de 180 min detectado a 215 nm. Columna Phenomenex Bondclone 10 C18. Gradiente de agua-TFA/ acetonitrilo-TFA: 0 a 9% en 4 VC, luego 9% a 33% en 25 VC. Elución final con 100% de acetonitrilo-TFA. 1,2 y 3: fracciones con mayor actividad inhibitoria de la ECA.

Fracción (tiempo de retención)	Porcentaje de actividad inhibitoria de la ECA
1. 44 min	90,3 ± 1,1
2. 82min	91,3 ± 0,5
3. 84 min	88,9 ± 5,1
Captopril (0,01 µg/ml)	94,1 ± 4,5

**Tabla 40.** Máximos valores obtenidos para la actividad inhibitoria de la ECA de distintas fracciones cromatográficas (hidrolizado de 180 min). Los valores se expresan como promedio de 2 determinaciones ± DS. Se ensayó además un control positivo de captopril. 1,2 y 3 corresponden a los picos en el cromatograma.

Con el fin de identificar posibles secuencias para los péptidos contenidos en las fracciones 1, 2 y 3 se realizó un análisis por espectrometría de masas (listado de masas detectadas, ver Anexo, Tabla A) y una interpretación de los resultados empleando el mismo procedimiento detallado en el apartado 5.2. De esta manera, se obtuvieron posibles secuencias provenientes de las caseínas bovinas para las masas mayoritarias, que posteriormente se alinearon con las de péptidos bioactivos provenientes de dichas caseínas (base de datos BIOPEP; Tablas 41 y 42). Cabe mencionar que las secuencias NLLRFFVAPFPEFGK y YQEPVLGPVRGPFPIIV (pico mayoritario en los hidrolizados de 60 y 180 min) fueron identificadas por la herramienta FindPept en la fracción cromatográfica 1 (con 1881,089 Da;  $\Delta$ masa=0,126).

Fracción (RP-HPLC)	Masa (MALDI-TOF)	Secuencia posible	Secuencia encontrada en la base BIOPEP	Procedencia	ID
1 44 min	984,615	PKHPIKHQ	RPKHPIKHQ	$\alpha_{s1}$ -caseína	7483
	1027,609	MKPWIQPK	AMKPWIQPK MKPWIQPK	$\alpha_{s2}$ -caseína	7497 y 3395 3398
2 82 min	1109,614	FVAPFPEVFG	FFVAPFPEVFGK	$\alpha_{s1}$ -caseína	7800
	898,609	VVPPFLQ	TPVVPPFLQP	$\beta$ -caseína	3503
	898,609	RGPFPIIV	VRGPFPIIV RGPFPIIV	$\beta$ -caseína	7566 8160
	898,609	VRGPFPII	VRGPFPIIV GPVRGPFPII	$\beta$ -caseína	7566 8169

**Tabla 41.** Solapamientos de las secuencias más pequeñas identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF con péptidos inhibidores de la ECA presentes en BIOPEP. Se indica la procedencia de los biopéptidos y el número de identificación en la base de datos (ID).

Fracción (RP-HPLC)	Masa (MALDI-TOF)	Secuencia Posible (FindPept)	Secuencia encontrada en la base BIOPEP	Procedencia	ID
1 44 min	2125,084	VDDKHYQKALNEINQFY	ALNEINQFY	$\alpha_{52}$ -caseína	7804
	1262,656	YFYPELFRQ	LFRQ	$\alpha_{51}$ -caseína	7661
2 82 min	1134,584	HQGLPQEVLN	LN	$\alpha_{51}$ -caseína	7832
	1983,085	TVYQHQAAMKPWIQPK	MKPWIQPK AMKPWIQPK	$\alpha_{52}$ -caseína	3398 7497
	1983,085	GPIPNSLPQNIPPLTQTPV	NIPPLTQTPV	$\beta$ -caseína	7495
	1109,614	PHLSFMAIPP	AIPP IPP	$\kappa$ -caseína	7668 3522
	2383,228	QDKIHQFAQTQSLVYFPFGPI	VYFPFGPI	$\beta$ -caseína	7492
	2255,158	DKIHQFAQTQSLVYFPFGPI	YFPFGPI		7665
3 84 min	2496,293	LQDKIHQFAQTQSLVYFPFGPI	VYFPFGPI YFPFGPI	$\beta$ -caseína	7492 7665
	1151,732	GPVIRGPFPIIV	VRGPFPIIV		$\beta$ -caseína
			GPFIIV RPFPIIV	8159 8160	

**Tabla 42.** Alineamientos para aquellos péptidos de mayor tamaño identificados por espectrometría de masas MALDI-TOF, cuyo extremo C terminal coincide con la secuencia de péptidos inhibidores de la ECA presentes en BIOPEP. Se indica la procedencia de los biopéptidos y el número de identificación en la base de datos (ID).

De esta manera, realizando una determinación de actividad inhibitoria de la ECA *in vitro*, seguida de un análisis *in silico* de datos provenientes de espectrometría de masas, se pudo realizar una posible identificación de los correspondientes biopéptidos (López-Fandiño *et al.*, 2006) y se encontró que en los hidrolizados de caseínas obtenidos con *M. pomifera* se liberarían varias secuencias potencialmente capaces de ejercer dicha actividad inhibitoria.

La mayor cantidad de péptidos cuyas secuencias coinciden con aquellas reportadas hasta el momento en BIOPEP, se hallaron en la fracción 2 de la cromatografía y sólo una de ellas proviene de la  $\kappa$ -caseína (PHLSFMAIPP, Tabla 42). El tripéptido C-terminal de esta secuencia es reconocido como uno de los más potentes inhibidores de la ECA alcanzando muy bajos valores de IC<sub>50</sub> y además es parte de la composición de la leche fermentada

*Ameal S<sup>TM</sup>* (Calpis, Japón) actualmente disponible en el mercado (Quirós *et al.*, 2005; Bütikofer *et al.*, 2006).

Las secuencias más largas (solapamientos en el C-terminal) podrían ser precursores de péptidos bioactivos. Pensando en una posible aplicación de esta preparación en alimentos, debe tenerse en cuenta que en el tracto gastrointestinal su actividad podría verse incrementada, o a partir de éstas secuencias sería posible que se liberen nuevos péptidos capaces de inhibir la ECA. La digestión con pepsina y tripsina puede promover la formación de péptidos bioactivos a partir de oligopéptidos provenientes de productos lácteos y muchos de éstos pueden luego absorberse enteros y ejercer su acción (Korhonen, 2009a). Por el contrario, puede ocurrir que en la digestión gastrointestinal se hidrolicen los péptidos bioactivos aunque se ha visto que, sobre todo aquellos que contienen prolinas, son resistentes a posteriores rupturas (Lignitto *et al.*, 2009). En este sentido, la simulación de la digestión gastrointestinal sería un próximo paso a realizar.

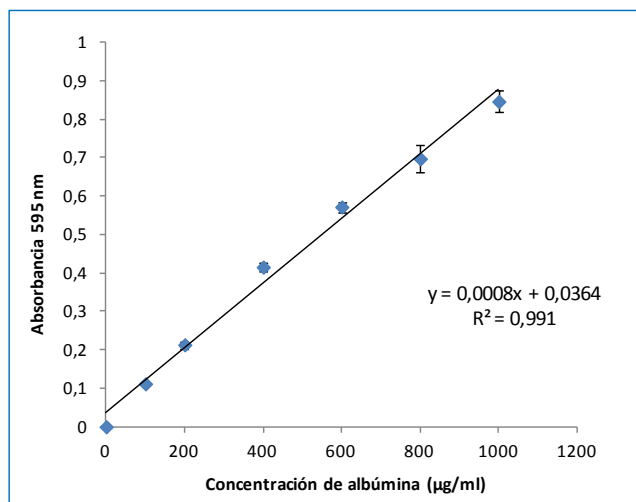
Por otra parte, la actividad detectada podría deberse a la presencia de biopéptidos aún no reportados. La confirmación de la identidad de los péptidos se realizará a futuro en estudios de secuenciamiento por espectrometría de masas en tándem (MALDI-TOF/TOF).

Finalmente, en muchos casos se ha reportado una falta de correlación entre la actividad inhibitoria de la ECA detectada *in vitro* e *in vivo* (Hartmann & Meisel, 2007), por lo que otro posible paso a seguir sería directamente la realización de ensayos *in vivo* en ratas hipertensas para determinar la biodisponibilidad y el efecto fisiológico de los péptidos.



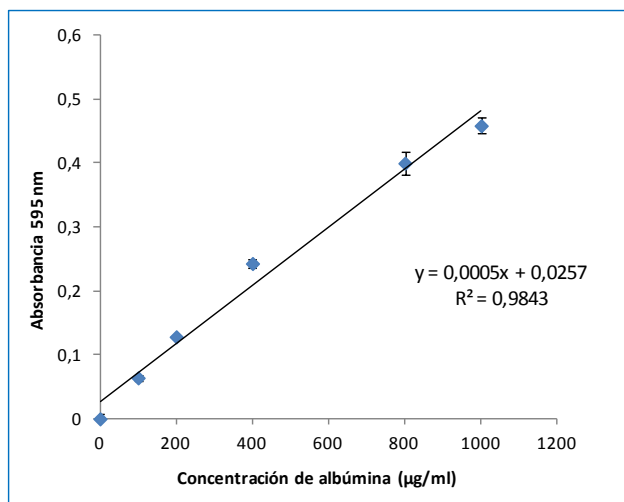
## Anexo

## Curvas de calibración

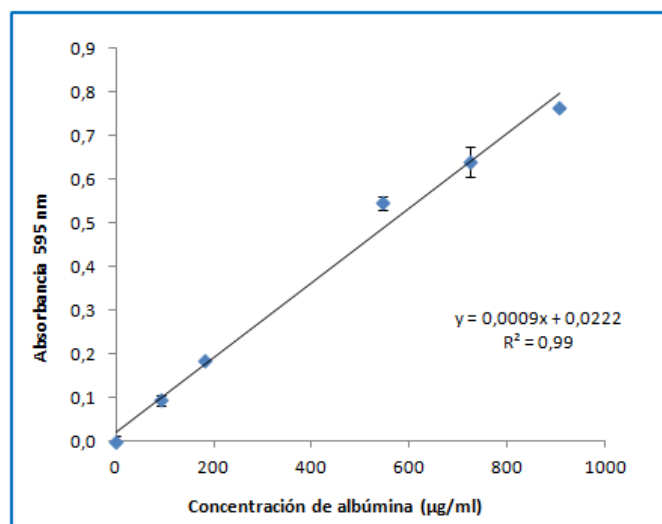


**Figura A.** Curva patrón para el ensayo de Bradford del EC realizado en 2010.

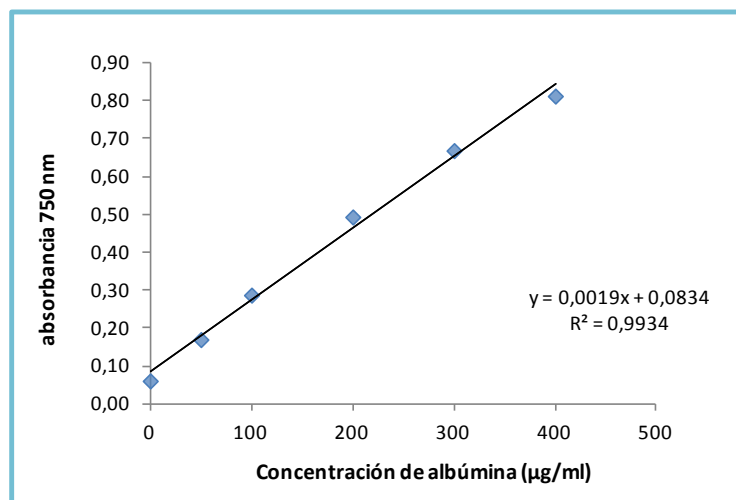
Se utilizaron distintas soluciones de albúmina patrón de las concentraciones que se indican. Los resultados se expresan como promedio de 3 determinaciones de Absorbancia a 595 nm para cada uno de los puntos de las curvas y las barras de error indican el DS. Las muestras fueron diluidas 1:2.



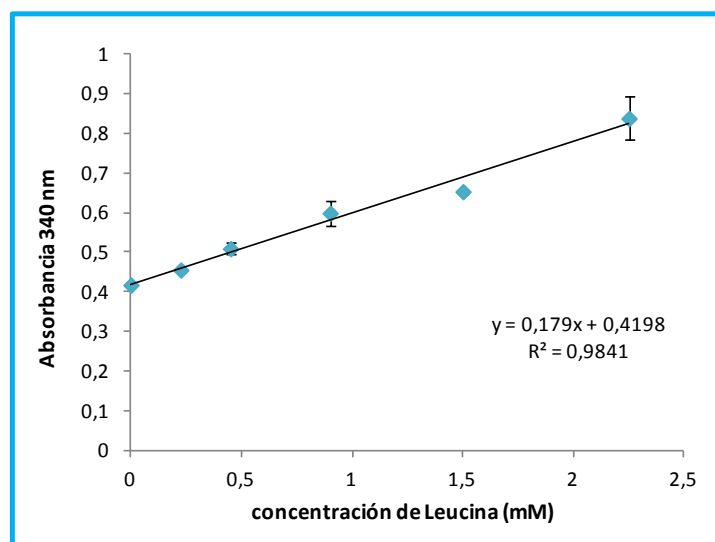
**Figura B.** Curva patrón para el ensayo de Bradford del EC y del PER realizados en 2012.



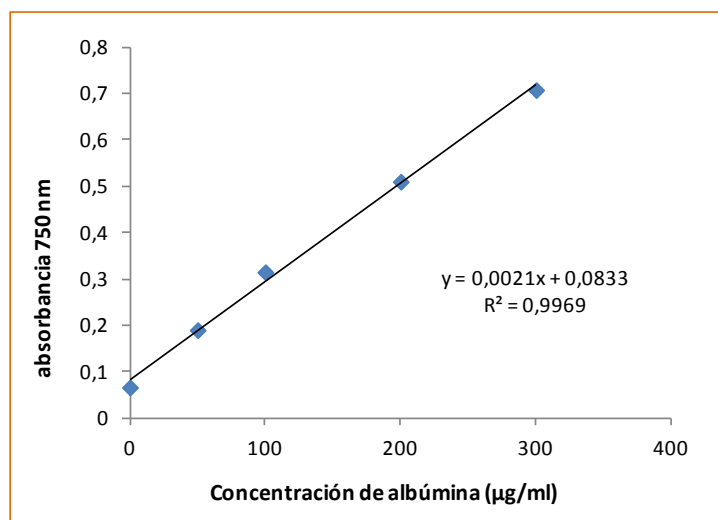
**Figura C.** Curva patrón para el ensayo de Bradford del EC almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y del PER (año 2010). Los resultados se expresan como promedio de 3 determinaciones de Absorbancia a 595 nm para cada uno de los puntos de la curva y las barras de error indican el DS. Las muestras fueron diluidas 1:2.



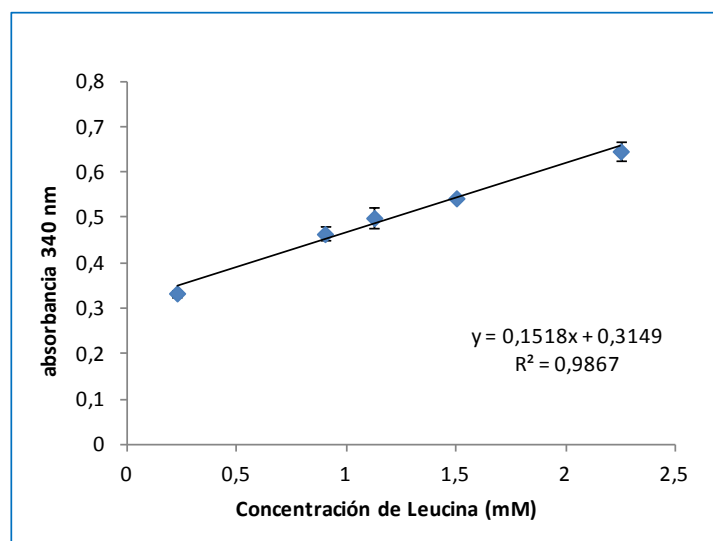
**Figura D.** Curva de calibración para la medición de la concentración de péptidos en los lactosueros obtenidos coagulando con quimosina o con EC por el método de Lowry. Las muestras fueron diluidas 1:50.



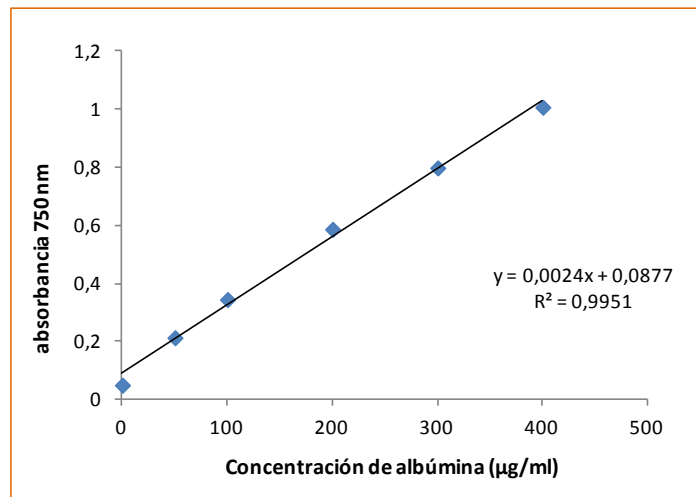
**Figura E.** Curva de calibración para el ensayo del TNBS realizado sobre las muestras de hidrolizados. Los resultados se expresan como promedio de 3 determinaciones de Absorbancia a 340 nm para cada uno de los puntos de la curva y las barras de error indican el DS.



**Figura F.** Curva de calibración para la medición de la concentración de péptidos por el método de Lowry en los hidrolizados.



**Figura G.** Curva de calibración para el ensayo del TNBS realizado sobre el segundo stock de hidrolizados. Los resultados se expresan como promedio de 3 determinaciones de Absorbancia a 340 nm para cada uno de los puntos de la curva y las barras de error indican el DS.



**Figura H.** Curva de calibración para la medición de la concentración de péptidos por el método de Lowry en el segundo stock de hidrolizados.



## Listado de masas

masas obtenidas por MALDI-TOF (en Da)		
Fracción 1 (44 min)	Fracción 2 (82 min)	Fracción 3 (84 min)
509,531	212,149	229,264
718,461	234,130	740,421
978,592	594,424	787,565
984,615	898,609	990,441
1027,657	1022,643	1006,416
1027,609	1109,614	1028,390
1220,651	1134,584	990,487
1235,663	1262,656	1006,446
1571,771	1765,970	1022,444
1737,999	1870,019	1028,439
1782,964	1983,085	1151,732
1881,089	2005,102	1293,657
1991,166	2100,178	1882,088
1997,015	2241,192	1907,926
2125,084	2255,158	1983,059
2141,075	2263,184	2005,073
2242,199	2271,168	2021,070
	2272,116	2089,183
	2277,135	2203,230
	2293,120	2255,135
	2366,240	2260,375
	2369,282	2366,170
	2383,228	2383,182
	2383,257	2388,179
	2399,234	2404,167
	2405,224	2496,293
	2421,204	2606,486
	2496,316	

**Tabla A.** Listado de las masas (en Da) detectadas por espectrometría de masas MALDI-TOF en las fracciones 1, 2 y 3 del cromatograma del hidrolizado de 180 min filtrado.

• • •

# Conclusiones

• • •   • • •

## Conclusiones

- A Partir de látex de frutos maduros de *M. pomifera* se obtuvieron extractos crudos proteolíticamente activos con actividad variable (de 2,4 a 7,7 Ucas/mg).
- El extracto crudo se inactivó totalmente luego de 10 min a 100 °C, mientras que durante 6 meses de almacenamiento a -20 °C, la actividad específica disminuyó a la mitad.
- Esta preparación presentó en el SDS-PAGE 5 bandas proteicas principales de masas moleculares 56,1; 29,5; 27,9; 26,1 y 9,2 kDa.
- En el isoelectroenfoco se observaron 10 bandas de pI 3,7; 4,2; 4,5; 5,5; 6,0; 6,5; 7,3; 8,0; 8,7 y 9,2, comprobándose en el zimograma que las bandas de  $pI \geq 6,0$  y la de 4,2 presentan la mayor actividad caseinolítica.
- Se realizó una purificación preliminar por precipitación etanólica, obteniéndose un extracto parcialmente purificado denominado PER, que presentó una máxima actividad residual de 62% respecto del extracto crudo.
- Por cromatografía de intercambio catiónico se obtuvo una fracción purificada de pI 8,7, cuyas constantes cinéticas frente al sustrato N- $\alpha$ -CBZ-*p*-nitrofenil éster de alanina resultaron en un  $K_M$  de  $5,37 \pm 1,68$  mM y de una  $v_{m\acute{a}x}$  de  $0,0059 \pm 0,0008$  s<sup>-1</sup> ó  $0,44 \pm 0,06$  U<sub>CBZ</sub> (aproximación hiperbólica).
- El extracto crudo presentó una fuerza coagulante de la leche de 50 IMCU/ml, coagulando en una proporción de volúmenes de 1/10000 respecto de la leche.
- Se encontró una dependencia lineal entre el tiempo de coagulación y la dilución del extracto crudo a 30, 35 y 40 °C y el tiempo de coagulación no disminuyó notablemente con concentraciones de CaCl<sub>2</sub> por encima de 25 mM.
- El lactosuero exudado durante la coagulación, filtrado con membrana de 5 kDa, presentó una concentración de péptidos provenientes de la proteólisis de  $2,7 \pm 0,3$  mg/ml.

- Se detectó la presencia de actividad antioxidante e inhibitoria de la ECA en el lactosuero obtenido coagulando la leche con el extracto crudo lo que aumentaría su valor agregado.
- El PER resultó adecuado para obtener hidrolizados de caseínas bovinas, determinándose las mejores condiciones de hidrólisis (pH 9,0, 45 °C, dilución del PER de 1:5, proporción de PER/caseína de 1:9, tiempos de 0 a 180 min).
- El perfil electroforético y cromatográfico (RP-HPLC) de los hidrolizados fue constante en los últimos tiempos de hidrólisis, lo que indicaría una cierta especificidad de corte por parte de las enzimas proteolíticas.
- En condiciones suaves de hidrólisis (37 °C ó 45 °C y tiempos cortos) se visualizaron 2 bandas persistentes de 18,0 y 19,8 kDa que fueron identificadas por MALDI-TOF como provenientes de la  $\alpha_{s2}$ -caseína.
- Se observó un incremento en la concentración de péptidos menores a 3 kDa a lo largo del tiempo de reacción proteolítica, alcanzándose un grado de hidrólisis entre 10 y 11% a los 180 min.
- Se detectó actividad antioxidante por ambos métodos empleados (DPPH y  $\beta$ -caroteno) pero se concluyó que el compuesto responsable de este efecto provendría del PER y no de algún producto de hidrólisis de las caseínas.
- La mayor actividad inhibitoria de la ECA se detectó en los hidrolizados de 60 y 180 min, siendo las  $IC_{50}$  de  $2,6 \pm 0,3$  y  $4,8 \pm 0,4$  mg/ml, respectivamente.
- Se realizó una purificación preliminar por RP-HPLC de los péptidos del hidrolizado de 180 min, encontrándose máxima actividad inhibitoria en las fracciones de tiempos de retención 44, 82 y 84 min.
- El análisis *in silico* de los datos de masas (MALDI-TOF) permitió realizar una posible identificación de algunos de los péptidos con actividad inhibitoria de la ECA por coincidencias con aquellos reportados en BIOPEP.
- El empleo de PER sería promisorio en la obtención de hidrolizados de proteínas lácteas con actividad inhibitoria de la ECA, con potencial uso en la manufactura de alimentos funcionales con acción antihipertensiva.



## Referencias . . .



## Referencias

- Adler-Nissen, J. (1979). "Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **27**: 1256-1262.
- Akuzawa, R.; Takayuki, M. & Kawakami, H. (2009). Sección II: "Bioactive Components in Manufactured Dairy Products", capítulo 8: "Bioactive Components in Caseins, Caseinates, and Cheeses" en "Bioactive Components in Milk and Dairy Products". Wiley-Blackwell. Editor: Park, Y.W. ISBN-13: 978-0813819822. Págs: 217-220. Weinheim, Germany.
- Alais, C. (1984). "Science du lait, principes des techniques laitières", 4ta edición, SEPAIC Editions, Paris, Francia.
- Aleixandre, A.; Miguel, M. & Mugerza, B. (2008). "Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de leche y huevo", *Nutrición Hospitalaria*, **23**: 313-318.
- Altuner, E.M.; İşlek, C.; Çeter, T. & Alpas, H. (2012). "High hydrostatic pressure extraction of phenolic compounds from *Maclura pomifera* fruits", *African Journal of Biotechnology*, **11**: 930-937.
- Ashwell, M. (2002a). Introducción: "Adelantos de la ciencia de la nutrición" en "Conceptos sobre los alimentos funcionales". International Life Sciences Institute, ILSI Press. ISBN: 1-57881-157-0. Págs: 3-5. Washington DC, USA.
- Ashwell, M. (2002b). "Los alimentos funcionales y la salud" en "Conceptos sobre los alimentos funcionales". International Life Sciences Institute, ILSI Press. ISBN: 1-57881-157-0. Págs: 6-15. Washington DC, USA.
- Barrett, A.J.; Rawlings, N.D. & Woessner, J.F. (2004a). "Preface- Introduction" en "Handbook of Proteolytic Enzymes". 2<sup>nd</sup> Edition. Elsevier. ISBN: 9780123822192. London, UK.
- Barrett, A.J.; Rawlings, N.D. & Woessner, J.F. (2004b). "Cysteine peptidases" en "Handbook of Proteolytic Enzymes". 2<sup>nd</sup> Edition. Elsevier. ISBN: 9780123822192. Págs: 1051-1077. London, UK.
- Bertucci, J.I. (2012). "Búsqueda de péptidos bioactivos en hidrolizados de lactosuero bovino obtenidos empleando fitoproteasas". Trabajo de Tesis de Grado, UNLP. Págs 39 y 40.
- Bezawada, J.; Yan, S.; John, R.; Tyagi, R. & Surampalli, R. (2011). "Recovery of *Bacillus Licheniformis* alkaline protease from supernatant of fermented wastewater sludge

- using ultrafiltration and its characterization”, *Biotechnology Research international*, Article ID: 238549, 11 págs.
- Bhalodi, M.; Shukla, S. & Saluja, A.K. (2008). “In-vitro Antioxidant activity of the flowers of *Ipomoea aquatica* Forsk”, *Pharmacognosy Magazine*, **4**: 226-230.
- Bradford, M.B. (1976). “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
- Bressani, R. (1994). “Composition and nutritional properties of amaranth” en “Amaranth Biology, Chemistry and Technology”. CRC Press. Editor: Paredes-López, O. Págs: 185-206. Boca Raton, Florida, USA.
- Bruno, M.; Lazza, C.; Errasti, E.; López, L.M.I.; Caffini, N. & Pardo, M. (2010). “Milk Clotting and Proteolytic Activity of an Enzyme Preparation from *Bromelia hieronymi* Fruits, *Food Science and Technology (LWT)*, **43**: 695-701.
- Bütikofer, U.; Meyer, J.; Sieber, R. & Wechsler, D. (2007). “Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses”, *International Dairy Journal*, **17**: 968-975.
- Caffini, N.O.; Natalucci, C. & Salas Bravo, C. (2009). “Tipos de proteasas, distribución y rol en los vegetales” en “Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores. Aplicaciones Industriales”. -Primera edición- Buenos Aires: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Editor: Dr. Caffini, N.O. ISBN: 9789879641361. Págs: 9 y 10. Buenos Aires, Argentina.
- Carmona, A.; Schwager, S.; Juliano, M.; Juliano, L. & Sturrock, E. (2006). “A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay”, *Nature Protocols*, **1**: 1971-1976.
- Chazarra, S.; Sidrach, L.; López-Molina, D. & Rodríguez-López, J.N. (2007). “Characterization of the milk clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus* L.) flowers”, *International Dairy Journal*, **17**: 1393-1400.
- Choi, C.W.; Kim, S.C.; Hwang, S.S.; Choi, B.K.; Ahn, H.J.; Lee, M.Y.; Park, S.H. & Kim, S.K. (2002). “Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison”, *Plant Science*, **163**: 1161-1168.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; González, L.; Tablada, E.M.; Díaz M.P.; Robledo, C. W. & Balzarini, M. (2000). Capítulo 8: “Análisis de Varianza” en “Estadística para las Ciencias Agropecuarias”. Sexta Edición. Editorial Brujas. Págs: 187-188. Córdoba, Argentina.

- Erdmann, K.; Cheung, B.W.Y. & Schröder, H. (2008). "The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease", *Journal of Nutritional Biochemistry*, **19**: 643-654.
- Fox, P.F. & Stepaniak, L. (1993). "Enzymes in Cheese Technology", *International Dairy Journal*, **3**: 509-530.
- Fox, P.F. (2009). Capítulo 1: "Milk: an overview", Abstract en "Milk Proteins: From Expression to Food". Elsevier Inc. Editores: Thompson, A.; Boland, M. & Singh, H. ISBN: 123740398. Pág 1. Massey University, New Zealand.
- Franck, A. (2002). Prólogo en "Conceptos sobre los alimentos funcionales". Autor: Ashwell, M. International Life Sciences Institute, ILSI Press. Editor: Roberfroid, M. ISBN: 1578811570. Pág 1. Bruselas, Bélgica.
- Hartmann, R. & Meisel, H. (2007). "Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications", *Current Opinion in Biotechnology*, **18**: 163-169.
- Hernández-Ledesma, B.; Contreras, M. & Recio, I. (2011). "Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods", *Advances in Colloid and Interface Science*, **165**: 23-35.
- Hou, L.; Zhu, Y. & Li, Q. (2010). "Characterization and preparation of broken rice proteins modified by proteases", *Food Technology and Biotechnology*, **48**: 50-55.
- Jovanović, S., Maćej, O. & Denin-Djurđević, J. (2002). "The influence of various factors on milk clotting time", *Journal of Agricultural Sciences*, **47**: 57-73.
- Konno, K.; Hirayama, C.; Nakamura, M.; Tateishi, K.; Tamura, Y.; Hattori, M. & Kdino, K. (2004). "Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex", *Plant Journal*, **37**: 370-378.
- Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2006). "Bioactive peptides: Production and functionality", *International Dairy Journal*, **16**: 945-960.
- Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2007). "Bioactive peptides from food proteins" en "Handbook of food products manufacturing: health, meat, milk, poultry, seafood, and vegetables". John Wiley & Sons. Inc. Hoboken. Editor: Hui, Y. H. Págs: 5-38. N. J., USA.
- Korhonen, H. (2009a). "Milk-derived bioactive peptides: From science to applications", *Journal of Functional Foods*, **1**: 177-187.
- Korhonen, H. (2009b). Sección I: "Bioactive Components in Milk", capítulo 2: "Bioactive Components in Bovine Milk" en "Bioactive Components in Milk and Dairy Products". Wiley-Blackwell. Editor: Park, Y. W. ISBN-13: 9780813819822. Weinheim, Germany.
- Kumari, M.; Sharma, A. & Jagannadham, M.V. (2010). "Decolorization of crude latex by activated charcoal, purification and physico-chemical characterization of religiosin, a

- milk-clotting serine protease from the latex of *Ficus religiosa*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 8027-8034.
- Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, **227**: 680-685.
- Lehninger, A.L.; Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2005). Capítulos 4, 5 y 6 en "Principles of Biochemistry". 4<sup>th</sup> Edition. W.H. Freeman. Págs: 190-236. New York, USA.
- Lignitto, L.; Cavatorta, V.; Balzan, S.; Gabai, G.; Galaverna, G.; Novelli, E.; Sforza, S. & Segato, S. (2009). "Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago d'allevio cheese", *International Dairy Journal*, **20**: 11-17.
- Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, Ch.A.; Krieger, M.; Scott, M.P.; Zipursky, L. & Darnell, J. (2004). "Molecular Cell Biology". 5<sup>th</sup> Edition. W.H. Freeman. Págs: 73-79. N.Y., USA.
- López-Fandiño, R.; Otteb, J. & van Campc, J. (2006). "Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity", *International Dairy Journal*, **16**: 1277-1293.
- López, L.M.I.; Sequeiros, C.; Trejo, S.A.; Pardo, M.F.; Caffini, N.O. & Natalucci, C.L. (2001). "Comparison of two cysteine endopeptidases from *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae)", *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, **382**: 875-878.
- López, L.M.I.; Natalucci, C.L.; Caffini, N.O. & Curotto, E. (1993). "Isolation and partial characterization of serine proteinases present in the latex of *Maclura pomifera* ("Osage orange") fruits", *Acta Alimentaria*, **22**: 131-142.
- López, L.M.I. (1995). "Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas presentes en el látex de frutos de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (Moraceae). Trabajo de Tesis Doctoral, UNLP. Pág 84.
- López, L.M.I. & Lazza, C.M. (2009). "Proteasas del género de *Moraceae*" en "Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores. Aplicaciones Industriales". -Primera edición- Buenos Aires: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Editor: Dr. Caffini, N. O. ISBN: 978-987-96413-6-1. Pág 71. Buenos Aires, Argentina.
- López, L.M.I.; Lazza, C.M.; Llerena Suster, C.; Torres, M.J. & Obregón, W.D. (2009). "Estrategias de purificación de proteasas" en "Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores. Aplicaciones Industriales". -Primera edición- Buenos Aires: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Editor: Dr. Caffini, N. O. ISBN: 978-987-96413-6-1. Págs: 151-152. Buenos aires, Argentina.
- López, M.C. (2007). "Alimentos funcionales y declaraciones de salud, desarrollo y legislación a nivel mundial y en MERCOSUR", IV JIPCA, CI: 19:33.
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Lewis Farr, A. & Randall, R. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-75.

- Lucey, J.A. & Fox, P.F. (1993). "Importance of Calcium and Phosphate in Cheese Manufacture: A Review", *Journal of Dairy Science*, **76**: 1714-1724.
- Macdermid, P.W. & Stannard, S.R. (2006). "A whey-supplemented, high-protein diet versus a high carbohydrate diet: effects on endurance cycling performance", *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, **16**: 65-77.
- Marshall, K. (2004). "Therapeutical applications of whey protein", *Alternative Medicine Review*, **9**: 136-156.
- Martínez Augustin, O. & Martínez de Victoria Muñoz, E. (2006). "Proteínas y péptidos en nutrición enteral", *Nutrición Hospitalaria*, **21**: 1-14.
- NC-IUBMB (1984) Enzyme Nomenclature "Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry on the Nomenclature and Classification of Enzymes". Academic Press, New York, USA.
- Nielsen, P.M. & Olsen, H.S. (2002). "Enzymatic modification of food protein" en "Enzymes in food technology". CRC Press. Editores: Whitehurst R.J. & Law, B.A. Págs: 109-43. Boca Raton, Florida, USA.
- Neurath, H. (1989). "The diversity of proteolytic enzymes" en "Proteolytic Enzymes. A Practical Approach". IRL Press. Editores: Beynon, R.J. & J.S. Bond. Págs: 1-13. Oxford, UK.
- Ong, L.; Henriksson, N. & Shah, N. (2007) "Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp.", *Le Lait* , **87**: 149-165.
- Peterson, G.L. (1979). "Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall", *Analytical Biochemistry*, **100**: 201-220.
- Phelan, M.; Aherne, A. & FitzGerald, R.J. (2009). "Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status", *International Dairy Journal*, **19**: 643-654.
- Pihlanto-Lepälä, A. (2001). "Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides", *Trends in Food Science & Technology*, **11**: 347-356.
- Pires, E.; Faro, C.; Macedo, I.; Esteves, C.; Morgado, J. & Verissimo, P. (1994). "Flor do cardo versus quimosina no fabrico de queijos artesanais", *Química Alimentaria*, **54**: 66-68.
- Quirós, A.; Ramosa, M.; Muguerza, B.; Delgado, M. A.; Miguel, M.; Aleixandre, A. & Recio, I. (2007). "Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*", *International Dairy Journal*, **17**: 33-41.

- Santibáñez Quezada, F. (2005) Capítulo 2: “Mercados Globales” en “Biotecnología para el uso sostenible de la biodiversidad. Capacidades locales y mercados potenciales”. Corporación Andina de Fomento. Editores: Quezada, F.; Roca, W.; Szauer, M.T.; Gómez, J.J. & López, R. ISBN: 9806810031. Págs: 48-49. Caracas, Venezuela.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). “Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa”, *Analytical Biochemistry*, **166**: 368–379.
- Schaller, A. (2004). “A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases”, *Planta*, **220**: 183-97.
- Silva, S.V. & Malcata, F.X. (2005a). “Partial identification of water-soluble peptides released at early stages of proteolysis in sterilized ovine cheese-like systems: influence of type of coagulant and starter”, *Journal of Dairy Science*, **88**: 1947-1954.
- Silva, S.V. & Malcata, F.X. (2005b). “Caseins as source of bioactive peptides”, *International Dairy Journal*, **15**: 1-15.
- Silverstein, R.M. (1974). “The assay of the bromelains Using N-CBZ-L Lysine p-nitrophenyl ester and N-CBZ-L Glycine p-nitrophenyl ester as substrates”, *Analytical Biochemistry*, **62**: 478-84.
- Singh, A.N. & Dubey, V.K. (2011). “Exploring applications of procerain B, a novel protease from *Calotropis procera*, and characterization by N-terminal sequencing as well as peptide mass fingerprinting”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **164**: 573-580.
- Smithers, G. W. (2008). “Whey and whey proteins- from ‘gutter-to-gold’”, *International Dairy Journal*, **18**: 695-704.
- Starovoitova, V.V.; Velichko, T.I.; Baratova, L.A.; Filippova, I.Y. & Lavrenova, G.I. (2005). “A comparative study of functional properties of calf chymosin and its recombinant forms”, *Biochemistry (Moscow)*, **71**: 320-324.
- Tepe, B.; Sokmen, M.; Akpulat, H.A. & Sokmen, A. (2005). “In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five *Allium* species from Turkey”, *Food Chemistry*, **92**: 89-92.
- Torruco-Uco, J.G.; Domínguez-Magaña, M.A.; Dávila-Ortíz, G.; Martínez-Ayala, A.; Chel-Guerrero, L.A. & Betancur-Ancona, D.A. (2008). “Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión”, *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, **6**: 158-168.
- Trejo, S.A.; López, L.M.I.; Cimino, C.V.; Caffini, N.O. & Natalucci, C. (2001). “Purification and characterization of a new plant endopeptidase isolated from the latex of *Asclepias fruticosa* L. (*Asclepiadaceae*)”, *Journal of Protein Chemistry*, **20**: 445-453.
- Tubeisha, Z.A. & Al-Delaimy, K.S. (2003). “Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolate of *Mucor*”, *International Journal of Dairy Technology*, **56**: 237-241.

- Vairo-Cavalli S.; Claver, S.; Priolo, N. & Natalucci, C. (2005). "Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate", *Journal of Dairy Research*, **72**: 272-275.
- Vallés, D.; Furtado, S.; Hernández, M.; Salas Bravo, C. & Cantera, A.M.B. (2009). "Potencialidades tecnológicas y perspectivas de aplicación" en "Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores. Aplicaciones Industriales". -Primera edición- Buenos Aires: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Editor: Dr. Caffini, N. O. ISBN: 978-987-96413-6-1. Págs: 221-235. Buenos Aires, Argentina.
- Vasbinder, A.J.; Rollema, H.S.; Bot, A. & de Kruif, C.G. (2003). "Gelation mechanism of milk as influenced by temperature and pH; studied by the use of transglutaminase cross-linked casein micelles", *Journal of Dairy Science*, **86**: 1556-1563.
- Veríssimo, P; Esteves, C.; Faro, C. & Pires, E. (1995). "The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. Contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities", *Biotechnology Letters*, **17**: 621-626.
- Vidal, A.; Fallarero, A.; Silva de Andrade-Wartha, E.R.; de Oliveira e Silva, A. M.; de Lima, A.; Pavan Torres, R.; Vuorela, P. & Mancini-Filho, J. (2006). "Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe", *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **42**: 589-600.
- Vishwanatha, K.S.; Appu Rao, A.G. & Singh, S.A. (2010). "Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **85**: 1849-1859.
- Westergaard, J.L.; Hackbarth, C.; Treuhaft, M.W. & Roberts, R.C. (1980) "Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures", *Journal of Immunological Methods*, **34**: 167-175.
- Wang, W.; Fujii, T. & Chen, S. (2008). "Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis", *Journal of Separation Science*, **31**: 2032-2039.
- Wu, Z.; Pan, D.; Zhen, X. & Cao, J. (2012). "Angiotensin-I Converting Enzyme-Inhibitory Peptides derived from bovine casein and identified by MALDI-TOF MS/MS", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, online ISSN: 1097-0010.
- Xia, Y. (2004). "Proteases in pathogenesis and plant defence", *Cell Microbiology*, **6**: 905-913.