

**POLITÉCNICA****UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID, UPM**

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS, E.T.S.I. AGRÓNOMOS

**CIAL**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN  
EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN**CSIC**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA  
ALIMENTACIÓN, CIAL-CSIC**

GRUPO DE BIOACTIVIDAD Y ALERGENICIDAD DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS ALIMENTARIOS, BIOPEP

**TRABAJO FIN DE MÁSTER****“CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA DE DIGERIDOS GÁSTRICOS  
SIMULADOS DE PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO”**

Autor:

**LISSET SHYRLENNE PANTOJA ARÉVALO****(Pantoja-Arévalo L.)**

TUTORÍA: DRA. BLANCA HERNÁNDEZ- LEDESMA, CSIC- CIAL, DRA. ISIDRA RECIO SÁNCHEZ, CSIC- CIAL. COORDINACIÓN DEL MÁSTER: DR. ANTONIO MORATA BARRADO, UPM

**MADRID, ESPAÑA****JULIO 2016**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero dejar constancia de mi profundo agradecimiento a todos quienes contribuyeron para el desarrollo del presente estudio. Mi reconocimiento especial a mis tutoras del CIAL: Dra. Blanca Hernández-Ledesma y Dra. Isidra Recio por el valioso aporte de conocimiento, ideas fundamentales, colaboración y asesoría para el desarrollo de este proyecto. Gracias a los integrantes del grupo BIOPEP del CIAL por su constante asesoramiento, guía y respaldo eficiente en cuanto a recomendaciones de laboratorio. Un general agradecimiento a todo el instituto por compartir su excelente experiencia en investigación con el presente estudio.

Agradezco enormemente a la Universidad Politécnica de Madrid, en especial al coordinador del Master en Ingeniería Alimentaria Aplicada a la Salud, Dr. Antonio Morata, por sus gestiones y conocimiento en cuanto al excelente programa de master cursado en la universidad.

Finalmente, quiero agradecer a mis familiares, amigos y colegas por el apoyo y consejos continuos que ayudaron a mejorar la calidad de la investigación de distintas maneras.

## I. ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	2
I. ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	iii
II. RESUMEN .....	5
III. ABSTRACT .....	6
IV. INTRODUCCIÓN .....	7
IV.I. LECHE Y SUS DERIVADOS.....	7
IV.II. SUERO DE LECHE .....	7
IV.III. PROTEÍNAS DE SUERO DE LECHE Y SUS BIOPÉPTIDOS.....	9
IV.III.I. $\beta$ - lactoglobulina y $\alpha$ - lactoalbúmina .....	9
IV.III.II. Bioactividad de los péptidos de $\beta$ -Lg y $\alpha$ -La .....	9
IV.IV. DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE PROTEÍNAS.....	10
IV.V. MECANISMOS EXPERIMENTALES PARA LA DIGESTIÓN DE PÉPTIDOS.....	13
IV.V.I. Modelos de digestión in vitro .....	13
IV.V.I.I. Digestión enzimática o preparación de hidrolizados enzimáticos .....	15
IV.V.I.II. Modelo pH-stat.....	16
IV.V.I.III. Simulador gastrointestinal SIMGI.....	17
IV.VI. INSTRUMENTACIÓN PARA ANÁLISIS DE PÉPTIDOS.....	19
IV.VI.I. Espectrometría de masas en Tándem (MS/ MS).....	19
IV.VI.II. RP- HPLC (MS/ MS) .....	20
IV.VII. PÉPTIDOS BIOACTIVOS PREVIAMENTE DESCRITOS.....	21
IV.VII.I. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de suero de leche	21
IV.VII.II. Péptidos opioides derivados de proteínas de suero de leche...	22
IV.VII.III. Péptidos antioxidantes derivados de proteínas de suero de leche	23
IV.VII.IV. Péptidos antimicrobiales derivados de proteínas de suero de leche	24

IV.VII.V.	<b>Péptidos antitrombóticos derivados de proteínas de suero de leche</b>	24
IV.VII.VI.	<b>Péptidos inmunomoduladores derivados de proteínas de suero de leche</b>	25
V.	<b>OBJETIVOS</b>	26
VI.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	27
VI.I.	<b>MUESTRAS</b>	27
VI.II.	<b>FLUIDOS DIGESTIVOS SIMULADOS (SSF Y SGF)</b>	27
VI.III.	<b>DIGESTIÓN IN VITRO CON PEPSINA</b>	28
VI.IV.	<b>LIOFILIZACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS</b>	29
VI.V.	<b>PRUEBAS ANALÍTICAS</b>	29
VI.V.I.	<b>Electroforesis en gel (SDS-PAGE)</b>	29
VI.V.II.	<b>Grado de Hidrólisis (TNBS)</b>	30
VI.V.III.	<b>Determinación de proteína (BCA)</b>	31
VI.V.IV.	<b>Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC MS/MS)</b>	31
VII.	<b>RESULTADOS</b>	33
VII.I.	<b>CONTROL DE LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON PEPSINA</b>	33
VII.II.	<b>DEGRADACIÓN PROTEICA MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)</b>	37
VII.V.	<b>IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS DE LA <math>\beta</math>-LACTOGLOBULINA Y <math>\alpha</math>-LACTOALBÚMINA</b>	43
VII.VI.	<b>APLICACIÓN DEL DIAGRAMA DE VENN</b>	49
VII.VII.	<b>COMPARACIÓN DE PÉPTIDOS DE LA <math>\beta</math>-LACTOGLOBULINA Y <math>\alpha</math>-LACTOALBÚMINA CON PÉPTIDOS PREVIAMENTE DESCRITOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA</b>	50
VIII.	<b>CONCLUSIONES</b>	53
IX.	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	54
X.	<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	56
XI.	<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	57

## II. RESUMEN

El suero de leche, derivado de la elaboración de quesos, ha sido considerado como un desecho o como un subproducto con usos no muy valorados. Su destino sigue siendo uno de los problemas más serios que enfrenta la industria láctea a nivel mundial. En el mercado existen productos que incluyen al lactosuero como ingrediente, principalmente como medio para aumentar los sólidos lácteos a un bajo costo y, en menor grado, para aprovechar algunas de sus propiedades funcionales de las proteínas del suero, tales como, formación de espuma, retención de agua libre y espesante. Debido a una continua actividad de investigación, se está logrando incrementar el número de aplicaciones funcionales (como fuente de péptidos con actividad biológica: hipotensivos, antioxidantes, antitrombóticos e inmunomoduladores, entre otros) y nutricionales (como fuente de energía, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales), promoviendo así el empleo del lactosuero como ingrediente y como alimento funcional. En los últimos años, relativamente pocos estudios han reportado la caracterización de fracciones peptídicas del lactosuero, en comparación con las derivadas de las caseínas, que han recibido mayor atención. En la presente investigación se caracterizaron las fracciones proteicas de las principales proteínas del lactosuero,  $\beta$ - lactoglobulina y  $\alpha$ - lactoalbúmina, como aporte a futuras investigaciones de evaluación de péptidos bioactivos.

Se llevó a cabo la hidrólisis enzimática de estas proteínas hasta péptidos utilizando pepsina como enzima en la que se evaluaron: los pesos moleculares de los hidrolizados (SDS-PAGE); el grado de hidrólisis alcanzado en la reacción (TNBS) y la cantidad de proteína presente en cada hidrolizado (BCA). Finalmente, se caracterizaron los péptidos derivados de 20 y 120 minutos de reacción de hidrólisis mediante la obtención de un perfil peptídico utilizando HPLC MS/ MS y se valoraron los fragmentos obtenidos comparándolos con información bibliográfica.

### III. ABSTRACT

Whey from bovine milk derived from cheese making, has been considered as a waste product or a product with non-highly valued uses. These uses represent one of the most serious problems of the industry worldwide. There are products in the market that include the whey as an ingredient, used to increase the milk solids at low cost and; in a lower magnitude, they are used to take advantage of some of its functional properties of whey proteins, such as foaming, retention free water and thickener. Due to continuous research activity, it is increasing the number of functional applications (as a source of peptides with biological activity: hypotensive, antioxidant, antithrombotic and immunomodulatory, etc.) and nutritional applications (as a source of energy, essential amino acids, vitamins and minerals), promoting both: the use of whey as an ingredient and as a functional food. In recent years, only few studies have been reported about whey principal proteins characterization. In contrast, those resulting from casein proteins have received more attention. In the present research, the protein fractions of whey main proteins,  $\beta$ - lactoglobulin and  $\alpha$ - lactalbumin were characterized as an input for future researches that include evaluation of bioactive peptides.

The enzymatic hydrolysis of  $\beta$ - lactoglobulin and  $\alpha$ - lactalbumin was carried out using pepsin as enzyme. To evaluate the hydrolysis, it was measured: the hydrolysates molecular weight (SDS- PAGE); the grade of hydrolysis achieved in the reaction (TNBS) and the amount of present protein on each hydrolysate (BCA). Finally, peptides derived from 20 and 120 minutes of hydrolysis reaction were characterized by obtaining a peptide profile using HPLC MS/ MS and the fragments obtained were evaluated by comparing them with bibliographic information.

## IV. INTRODUCCIÓN

### IV.I. LECHE Y SUS DERIVADOS

La leche y otros productos lácteos son fuentes importantes de nutrientes esenciales para la dieta humana. En la actualidad, no sólo los productos lácteos representan tal importancia sino también sus derivados ya que, además de suministrar energía, contienen proteínas, vitaminas y minerales de alto valor biológico. La leche se define como “el producto íntegro del ordeño completo e ininterrumpido de hembras lecheras sanas, bien alimentadas y no fatigadas. Ha de ser recogida higiénicamente y no debe contener calostro” (Hirigoyen 2014). Esta definición viene siendo aprobada desde 1908 por el «Congreso Internacional para la Represión de los Fraudes en los Alimentos» hasta la actualidad y engloba a la leche de algunas hembras de mamíferos.

La leche bovina es la leche de mayor consumo por la humanidad y su composición principal encierra: 87.2% de agua, 4.8% de lactosa, 3.7% de grasa, 3.4% de proteínas, 0.19% de NNP (nitrógeno no proteico) y 0.7% de cenizas. El 80% de sus proteínas son caseínas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\kappa$ ) y el porcentaje restante son proteínas del suero de leche ( $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, seroalbúmina y otras proteínas minoritarias) (Rodríguez-Hernández et al. 2014). La industria láctea representa una de las más importantes dentro del sector alimentario en los países desarrollados y se estima que el 90% del total de la leche bovina se utiliza en el sector quesero. Durante la producción de queso se produce, además, suero de leche el cual es utilizado para la obtención de lactosa, concentrados proteicos o es eliminado como producto de desecho.

### IV.II. SUERO DE LECHE

El suero de leche, llamado lactosuero, es un derivado lácteo y se define como una mezcla heterogénea obtenida durante la fabricación del queso, mediante la adición de ácido (suero ácido) o de enzimas del tipo cuajo como la renina (suero dulce). El suero dulce, tiene mayor cantidad de materia seca y mayor porcentaje de lactosa y proteína que el suero de leche ácido. El suero lácteo, se compone aproximadamente de 55% del total de ingredientes de la leche. La Tabla 1 muestra la composición del suero lácteo ácido y dulce. Históricamente, el suero de leche, cuando no es desechado, ha sido tratado de la mejor manera costo- beneficio mediante aplicaciones enfocadas en el consumidor, en alimentos y en la investigación. (Poveda E 2013)

Tabla 1 "Composición de suero de leche dulce y ácido"

Componente	Lactosuero dulce (g/L)	Lactosuero ácido (g/L)
Sólidos totales	63,0- 70,0	63,0- 70,0
Lactosa	46,0- 52,0	44,0- 46,0
Proteína	6,0- 10,0	6,0- 8,0
Calcio	0,4- 0,6	1,2- 1,6
Fosfatos	1,0- 3,0	2,0- 4,5
Lactato	2,0	6,4
Cloruros	1,1	1,1

A continuación, una tabla composicional de los aminoácidos mayoritarios en las proteínas de suero lácteo:

Tabla 2 "Contenido de aminoácidos esenciales del suero de leche (g/100g proteína)"

Aminoácido	Lactosuero	Huevo	Equilibrio recomendado por la FAO
Treonina	6,2	4,9	3,5
Cisteína	1,0	2,8	2,6
Metionina	2,0	3,4	2,6
Valina	6,0	6,4	4,8
Leucina	9,5	8,5	7,0
Isoleucina	5,9	5,2	4,2
Fenilalanina	3,6	5,2	7,3
Lisina	9,0	6,2	5,1
Histidina	1,8	2,6	1,7
Triptófano	1,5	1,6	1,1

(Huertas 2009)

Entre las aplicaciones más comunes pensadas para el consumidor se encuentran: las bebidas isotónicas o hidratantes, refrescantes, fermentadas, y las bebidas alcohólicas. En la industria alimentaria, en general, se utiliza el suero de leche para: formación de espuma, retención de agua libre, fuente de lactosa y espesante. Mientras que, para el sector de la investigación se utiliza: el suero procesado a materia prima en polvo a diferentes grados de concentrado y aislado (WPC *Whey Protein Concentrate* y WPI *Whey Protein Isolate*). Pero estas aplicaciones, apenas acaparan con una pequeña porción del potencial funcional que puede llegar a tener el suero de leche debido a las características de los péptidos que conforman sus proteínas principales:  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina, con el mayor porcentaje de concentración frente al total de proteínas del suero. (Alvarado Carrasco and Guerra 2010)



### **IV.III. PROTEÍNAS DE SUERO DE LECHE Y SUS BIOPÉPTIDOS**

#### **IV.III.I. $\beta$ - lactoglobulina y $\alpha$ - lactoalbúmina**

Las proteínas séricas principales,  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina, son macromoléculas y componentes estructurales celulares esenciales debido a las numerosas funciones que desempeñan en el organismo. La  $\beta$ -Lactoglobulina es la proteína sérica dominante en el suero de leche bovina. Constituye aproximadamente el 60% de la proteína total del suero de leche a una concentración de 2,3 a 4,9 g/L. La  $\beta$ -Lg es una proteína globular pequeña con una masa molecular monómera de 18kDa a  $\text{pH} \leq 3$  y una secuencia de 162 aminoácidos. Por otra parte, la  $\alpha$ -lactoalbúmina se encuentra a una concentración de 1 a 1.5 g/L en la leche bovina y posee una secuencia de 123 aminoácidos. Su principal función es la síntesis de lactosa a partir de glucosa y galactosa en la glándula mamaria. Además, su composición estructural posee aminoácidos esenciales (63% del total) como el triptófano, cisteína y lisina (Peso Echarri et al. 2012).

La hidrólisis de estas proteínas da como resultado la generación de péptidos; los cuales, además de cumplir con su función nutricional, son capaces de ejercer beneficios biológicos específicos. A estos péptidos se los denomina péptidos bioactivos o biopéptidos. Su bioactividad depende de la secuencia y número de aminoácidos que lo integran, éstos pueden contener entre 2 y 20 aminoácidos. La  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina del suero de leche bovina son consideradas una de las principales fuentes de péptidos bioactivos que presentan efectos positivos sobre la salud del consumidor. Los biopéptidos más comunes provenientes de la  $\beta$ -lactoglobulina son Leu-Ala-Met-Ala y Val-Phe-Lys; mientras que, los fragmentos Trp-Leu-Ala-His-Lys y Tyr-Gly-Leu, de la  $\alpha$ -lactoalbúmina.

A nivel de laboratorio, se realizan hidrolizados de estas proteínas partiendo de concentrados de suero de leche (WPC) elaborados industrialmente y específicamente para fines de investigación experimental. Los WPC son elaborados por la ultrafiltración, que consiste en una membrana semipermeable, la cual selectivamente permite pasar materiales de bajo peso molecular como: agua, iones y lactosa; mientras que, retiene materiales de peso molecular alto como la proteína. El retenido es así, concentrado por evaporación y liofilizado. El WPC es definido por el

#### **IV.III.II. Bioactividad de los péptidos de $\beta$ -Lg y $\alpha$ -La**

La  $\beta$ - lactoglobulina está asociada con la unión y el transporte de pequeños compuestos hidrofóbicos y anfifílicos para aumentar su biodisponibilidad. Sus biopéptidos ejercen

funciones regulatorias como la lactostatina, que regula el colesterol sérico disminuyendo su solubilidad micelar, es decir, reduce su absorción intestinal, así como la inducción de la transcripción de la enzima responsable de metabolizar el colesterol, colesterol-7-hidroxilasa. Además existen fracciones de la  $\beta$ -lactoglobulina como: 15-20, 19-29, 12-46, 25-40, 78-83, 92-100 y 145-149 que presentan actividad antioxidante y los fragmentos Pro-Glu-Gly-Asp y Tyr-Leu-Leu-Phe que se reconocen por su actividad opioide. (Rodríguez-Hernández et al. 2014)

De acuerdo a diversos estudios, los biopéptidos de la  $\alpha$ -lactoalbúmina tienen efectos positivos sobre la absorción de minerales, actividad anticarcinogénica, actividad antimicrobiana, actividad prebiótica y antioxidante. Los estudios demuestran cómo influyen positivamente en la absorción de minerales como el hierro y zinc en el intestino de los niños. Además, estudios in vitro han demostrado que los biopéptidos de la  $\alpha$ -lactoalbúmina unidos al ácido oleico (complejo HAMLET) es efectiva frente a tumores celulares como el papiloma humano. Este complejo es también conocido por presentar un claro efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y cepas enteropatógenas de *Escherichia coli* y *Salmonella thypimurium*. Otro estudio in vitro, demostró que estos biopéptidos estimulan el crecimiento de bifidobacterias, uno de los grupos microbianos indicadores de la salud intestinal. Se ha estudiado también que las fracciones 1-15, 17-31, 109-114 de la  $\alpha$ -lactoalbúmina presentan actividades antioxidantes.

De esta manera, una aplicación sugerida de la  $\alpha$ -lactoalbúmina para el mayor aprovechamiento de sus biopéptidos sería: el enriquecimiento de la leche con  $\alpha$ -lactoalbúmina ya que podría conseguir una mayor biodisponibilidad de cationes divalentes ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Se}^{2+}$ ), siendo necesario añadir una menor proporción del mineral a fórmulas infantiles además de aportar con los otros tres beneficios mencionados para la salud intestinal (Peso Echarri et al. 2012). En base a esto, se puede considerar al suero de leche con biopéptidos como un ingrediente funcional.

#### **IV.IV. DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE PROTEÍNAS**

La digestión de las proteínas comienza en el estómago con la acción de la pepsina y continúa en el intestino delgado con enzimas pancreáticas como la tripsina, quimiotripsina, aminopeptidasas y carboxipeptidasas. Estas enzimas se secretan en su forma completa y son activadas por la escisión de una pequeña secuencia peptídica. Esta división es realizada por enterocinasas secretadas en el líquido intestinal. Las proteínas de la dieta estimulan la secreción de las proenzimas pancreáticas. El tripsinógeno se divide para formar tripsina y así, esta se une a las proteínas de la dieta para comenzar la hidrólisis. Cuando esta termina,

aumenta el contenido de tripsina libre en el intestino, lo que constituye una señal para cesar la secreción de tripsinógeno (SANZ). Luego, las oligopeptidasas y aminopeptidasas del borde epitelial del enterocito completan la digestión; cada una de estas enzimas tiene una acción específica. La tabla siguiente muestra una clasificación de las proteasas, que incluye tanto enzimas que actúan en el aparato digestivo humano como enzimas que se emplean en la obtención de hidrolizados de proteínas (enzimas utilizadas en la digestión in vitro).

*Tabla 3 "Clasificación de enzimas que intervienen en la digestión de proteínas"*

<b>Tipos de proteasas</b>			
<i>Endopeptidasas</i>		<i>Exopeptidasas</i>	
Serina proteasas	Tripsina (arginina, lisina) Quimotripsina (aminoácido aromático)	Carboxipeptidasas A B	Separan aminoácidos del extremo carboxilo Aminoácido neutral Aminoácido básico
SH proteasas	Papaína, bromelina	Aminopeptidasas	Separan aminoácidos del extremo amino
Aspartato proteasas	Pepsina, quimiosina		
Metaloproteasas	Colagenasa, termolisina	Dieptidasas	Separan dipéptidos
Otras	Renina, queratinasa		

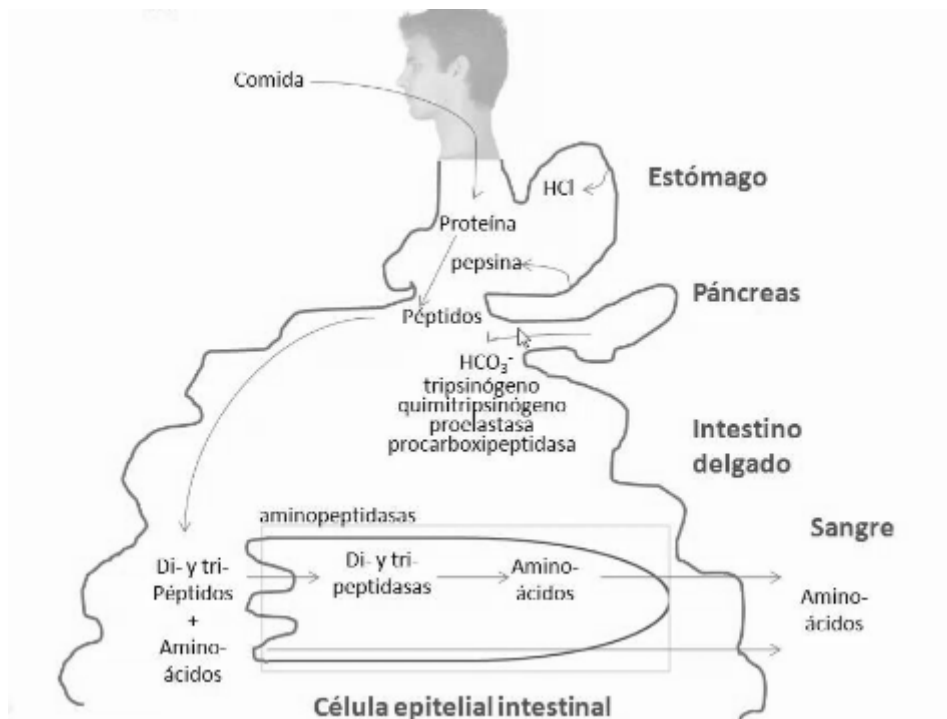
La mayoría de los péptidos de más de tres aminoácidos son hidrolizados extracelularmente por las enzimas del borde en cepillo de los enterocitos, mientras que los dipéptidos y los tripéptidos pueden ser absorbidos intactos. La absorción de péptidos y aminoácidos ocurre, principalmente, en el intestino delgado proximal, generalmente por transporte activo mediante transportadores específicos para los diferentes tipos de aminoácidos. Los dipéptidos, tripéptidos y oligopéptidos tienen también sistemas transportadores específicos. Se calcula que un 25 % de las proteínas de la dieta se absorben como dipéptidos y tripéptidos. Los aminoácidos se absorben en presencia de sodio y tanto éstos como los dipéptidos y tripéptidos se absorben rápidamente. Las dipeptidasas y tripeptidasas pueden hidrolizar posteriormente estos péptidos a aminoácidos, pero algunos alcanzan intactos la circulación sanguínea (SANZ).

También existe una absorción limitada de proteínas intactas con mucha menor frecuencia, bien a través de las uniones de las células epiteliales o bien por captación de vesículas desde la luz intestinal hasta la zona basal de estas células epiteliales. Esta absorción no tiene repercusión nutricional, pero puede ser importante desde un punto de vista inmunológico, porque puede dar lugar a respuestas alérgicas. Tras la digestión de proteínas, los aminoácidos son transportados al hígado, donde se regula el flujo de aminoácidos de la dieta que entra en la circulación sistémica. El hígado transamina y oxida los aminoácidos

sobrantes. En la práctica, el exceso de proteínas (aminoácidos) en la dieta de un sujeto sano da lugar a un aumento de la eliminación urinaria de nitrógeno. El hígado es el lugar principal de metabolización de aminoácidos esenciales, con excepción de los aminoácidos ramificados, que apenas se degradan en el eje enterohepático y son metabolizados por otros tejidos periféricos; por ejemplo, sólo un 2 % de la leucina de la dieta es oxidada en el hígado.

A continuación se presenta un esquema general de la digestión humana:

*Figura 1 "Esquema resumido de la digestión humana y sus proteasas implicadas"*



## **IV.V. MECANISMOS EXPERIMENTALES PARA LA DIGESTIÓN DE PÉPTIDOS**

### **IV.V.I. Modelos de digestión in vitro**

Para propósitos de evaluación alimentaria, la digestión in vitro es un método éticamente superior, más rápido y menos caro que un método in vivo. Posee una interacción animal/ alimento más valiosa que un análisis químico puro y además, utiliza un tamaño de muestra muy pequeño (Coles, Moughan and Darragh). Una ventaja importante de la digestión in vitro es que hay investigaciones que indican que tiene una alta correlación con las digestiones in vivo cuando se compara solo un tipo de macromoléculas del mismo origen (animal o vegetal). Estos modelos se definen como simulaciones gastrointestinales. En el presente estudio, se aplica un modelo in vitro que utiliza hidrólisis enzimática como alternativa para luego caracterizar sus péptidos o fragmentos bioactivos. La digestión enzimática es crucial para que los biopéptidos tengan una actividad que alcance los tejidos donde han de ejercer su acción en concentraciones suficientes para tener un efecto biológico. Algunas investigaciones indican que durante el proceso natural de digestión, las enzimas proteolíticas gastrointestinales pueden inactivar péptidos o liberarlos de su proteína de origen donde se encontraban inactivos, presentando propiedades funcionales. (Segura-Campos, Chel-Guerrero and Betancur-Ancona 2010)

Ventajosamente, algunos fragmentos biopeptídicos son resistentes a procesos de hidrólisis y son susceptibles de ser absorbidos en cantidades fisiológicamente activas alcanzando intactos la circulación sanguínea. Durante la digestión, también se pueden encontrar factores que afectan la absorción oral de los péptidos tales como: las diferencias metabólicas, anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del tracto gastrointestinal, la actividad enzimática del mismo, la pobre permeabilidad de los biopéptidos al cruzar las membranas biológicas; y también, su naturaleza hidrofílica y tamaño molecular.

Los modelos de simulación gastrointestinal in vitro se clasifican en modelos estáticos y modelos dinámicos. Los modelos dinámicos son los más complejos ya que simulan cambios tanto físicos, como de absorción de nutrientes, movimientos peristálticos, cambios químicos, modificación del pH y empleo de secreciones a lo largo de la digestión. Dentro de ambos tipos de modelos principales están: los modelos monocompartimentales, los multicompartimentales, los que poseen una única cámara y los modelos en los que existe tránsito entre dos o más regiones simuladas respectivamente.

De acuerdo a Minekus, una digestión in vitro necesita de fluidos digestivos simulados y propone que los fluidos: salivar simulado (SSF), gástrico simulado (SGF) e intestinal simulado

(SIF) están hechos de su correspondiente solución stock de electrolitos que se presenta en la tabla a continuación:

*Tabla 4 "Preparación de los fluidos de digestión de solución stock de electrolitos a 1.25X de concentración"*

	<b>SSF<sub>stock</sub></b> <b>(Simulated salivary fluid,</b> <b>FluidoSalivarSimulado)</b> <b>(pH 7)</b>	<b>SGF<sub>stock</sub></b> <b>(Simulated Gastric fluid,</b> <b>FluidoGástricoSimulado)</b> <b>(pH 3)</b>
<b>Solución de sal</b> <b>añadida</b>	<b>mmol/ L</b>	<b>mmol/ L</b>
<b>KCl</b>	15.1	6.9
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	3.7	0.9
<b>NaHCO<sub>3</sub> *</b>	13.6	25
<b>NaCl</b>	-	47.2
<b>MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub></b>	0.15	0.12
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> *</b>	0.06	0.5
<b>CaCl<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)</b>	1.5	0.15
<b>HCl</b>	1.1	15.6

(Minekus et al. 2014)

#### **IV.V.II. Digestión enzimática o preparación de hidrolizados enzimáticos**

La digestión enzimática se trata del diseño de un reactor en donde ocurren reacciones hidrolíticas controladas ya sea mediante el estudio de las condiciones de operación óptimas (pH, temperatura, tiempos de digestión, etc.) o a través del estudio cinético de la reacción. Estudios realizados en la Universidad de Granada en España han estudiado la cinética específica de la hidrólisis enzimática de las proteínas del suero de leche con proteasas comerciales de origen bacteriano y animal. Los datos obtenidos de estas investigaciones se ajustan a la siguiente ecuación de velocidad:

$$r_h = S_0 \frac{dx}{dt} = k_h(e_0 - \epsilon S_0) \exp\left(-\frac{k_d}{k_h}x\right)$$

(Guadix et al. 2000)

Las investigaciones que han utilizado las cinéticas de las reacciones nos han permitido obtener información valiosa acerca de las condiciones óptimas que requieren las enzimas digestivas para que actúen sobre su sustrato. De manera general, el óptimo de actividad de las enzimas proteolíticas para el extracto estomacal se sitúa en valores de pH entre 2,0 y 2,5 y para las intestinales entre pH 9,5 y 10,0. El extracto de estómago se mostró muy estable a distintos valores de pH, excepto a pH 12. A continuación se muestra una tabla de las condiciones óptimas que presentan algunas proteasas.

*Tabla 5 "Condiciones óptimas de algunas proteasas de importancia en la hidrólisis enzimática"*

<b>Jugo digestivo</b>	<b>Secretado por</b>	<b>Enzima</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Sustrato</b>
Saliva	Glándulas salivales	Amilasa	7,0	25 - 37 °C	Almidón
Jugo gástrico	Glándulas de la pared estomacal	Proteasa (pepsina)	1,0	25 - 37 °C	Proteínas
Jugo pancreático	Páncreas	Amilasa Proteasa (tripsina) Lipasa	≈ 8	25 - 37 °C	Almidón Proteínas Lípidos
Jugo intestinal	Células de la pared del intestino delgado	Proteasa Otras enzimas (maltasa)	≈ 8	25 - 37 °C	Proteínas péptidos Azúcares simples

(Banet and Núñez 1992)

La hidrólisis enzimática de las proteínas de suero lácteo se inicia con una solución de concentración conocida de proteínas, a la cual se le adiciona una enzima específica y se incuba por un tiempo determinado para obtener el grado de hidrólisis deseado. Luego se fracciona el hidrolizado por cromatografía de exclusión (SEC) y/o por cromatografía líquida semi-preparativa en fase inversa (RP-HPLC), seleccionándose la fracción con mayor actividad in vitro y finalmente se identifica la secuencia de los péptidos responsables de dicha actividad aplicando espectrometría de masas (LC-MS/MS) o secuenciación N-terminal. (Alvarado Carrasco and Guerra 2010). Los hidrolizados son mezclas complejas y pueden contener hasta cientos de diferentes moléculas, por lo cual, localizar péptidos bioactivos en este tipo de muestras ha sido comúnmente una tarea difícil y que requiere mucho tiempo y dedicación. Las fracciones usualmente contienen aún múltiples compuestos que requieren ciclos adicionales de fraccionamiento, concentración y evaluación de bioactividad para lograr identificar la molécula responsable de dicha actividad (Alvarado Carrasco and Guerra 2010).

#### ***IV.V.III. Modelo pH-stat***

Este modelo permite cuantificar la influencia de parámetros específicos con una reacción a un pH determinado. El sistema pH-stat se compone por un electrodo selectivo, o también llamado electrodo de metal, una bomba o una bureta y es un sistema fuertemente tamponado independientemente de la concentración de la solución titulante. Los tres objetivos principales son: determinar un valor óptimo de pH de la reacción química en estudio, mantener el pH constante añadiendo un reactivo para neutralizar iones  $\text{OH}^-$  o  $\text{H}_3\text{O}^+$  y calcular la cinética de la reacción estudiada basada en el consumo del reactivo requerido para mantener el pH constante a lo largo del tiempo (Segura-Campos et al. 2010).

En términos de digestión alimentaria, pH-stat se considera un modelo de digestión in vitro estático que puede incluir tanto a las enzimas digestivas (pancreatina, pepsina, tripsina, quimotripsina, peptidasa,  $\alpha$ -amilasa y lipasa) como a los fluidos salivar, gástrico e intestinal. Se aplican de 2 a 3 horas de digestión a 37°C acoplado a un reactor que puede ser de hasta 500mL con agitación moderada. En el sistema se hidrolizan macromoléculas, como por ejemplo, proteínas, carbohidratos, grasas, etc. a una concentración conocida disuelta en agua ultrapura tipo I (Segura-Campos et al. 2010). Los resultados son interpretados en términos de diferencias en las concentraciones de reactivos, productos, catalizadores o cofactores manteniendo el pH estable en cada paso de la digestión. La siguiente figura ilustra el modelo más reciente del sistema pH-stat.

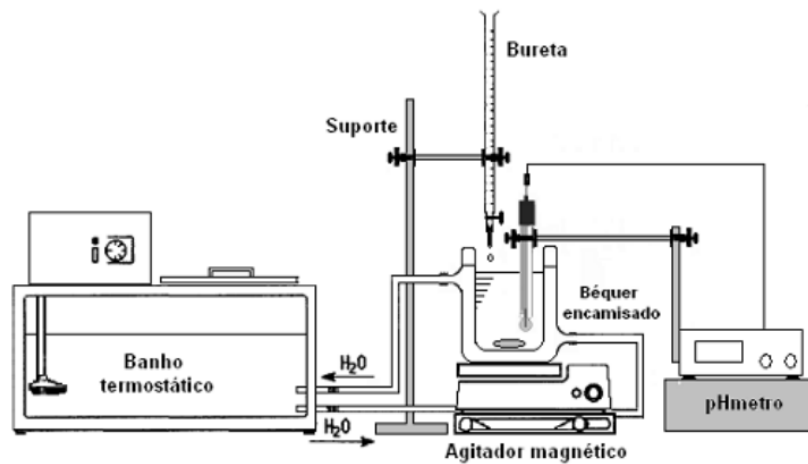


Figura 2 "Estación de trabajo de titulación pH Stat Titrilab 854 de Radiometer Analytical (una marca de la compañía Hach)"



A continuación se muestra también el esquema pH- stat acoplado a un baño de 37°C y aun agitador magnético:

Figura 3 "pH- stat acoplado a un baño termostático y agitador magnético"



#### **IV.V.I.III. Simulador gastrointestinal SIMGI**

El simulador gastrointestinal SIMGI es un modelo de digestión in vitro dinámico que representa de manera conjunta los procesos de digestión gastrointestinal y fermentación colónica que tienen lugar en el sistema digestivo del hombre. Se trata del sistema más completo y más reciente en donde intervienen todos los procesos gastrointestinales de los seres

humanos. Está formado por 5 compartimentos: estómago, intestino delgado, colon ascendente (CA), transverso (CT) y descendente (CD) gobernados por un autómata u ordenador. Durante el proceso de simulación, generalmente se mantienen todos los compartimentos a 37°C y en condiciones anaerobias mediante un flujo constante de nitrógeno. El sistema hace posible la toma de muestras en los 5 compartimentos que lo componen (Cueva et al. 2015). Existen modelos muy parecidos al modelo SIMGI del CIAL (Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, Madrid- España) como el modelo AINIA (Centro Tecnológico de Valencia-España) y el modelo SHIME (modelo de la Universidad de Gante, Bélgica).

La estructura del modelo SIMGI comprende cajas controladoras y bombas que regulan el flujo de líquidos o fluidos (ácido, base, jugo gástrico, alimento) y de gases (nitrógeno). El sistema se alimenta de forma continua con un medio nutritivo y, de forma programada, se incorpora ácido clorhídrico para simular las condiciones ácidas del contenido procedente del estómago y jugo pancreático. El carácter automatizado del SIMGI controlado por ordenador permite el trabajo en continuo e ininterrumpido del sistema (Muñoz-González 2014). La Figura 5 muestra la distribución de los compartimentos en el simulador dinámico gastrointestinal SIMGI.



*Figura 4 " Simulador dinámico del tracto gastrointestinal SIMGI. A) Estómago; B yC) Cajas controladoras; D) Intestino delgado; E, F y G) Colon ascendente, transverso y descendente, respectivamente; H) Bombas"*

## **IV.VI. INSTRUMENTACIÓN PARA ANÁLISIS DE PÉPTIDOS**

Actualmente, existen métodos de espectrometría de masas que refuerzan las estrategias de identificación de péptidos y proteínas tales como: el espectrómetro de tiempo de vuelo TOF, el método de ionización suave MALDI (matrix- assisted laser desorption ionization) y la ionización por electrospray (ESI) (Torres-Llanez, Vallejo-Cordoba and González-Córdova 2005).

Aunque la espectrometría de masas se utiliza para caracterizar una amplia variedad de analitos, los avances en la espectrometría de masas que se presentan en este trabajo, se centran en péptidos de origen lácteo. La espectrometría de masas se ha convertido en una herramienta importante para el análisis de proteínas y péptidos producidos a partir de la digestión de proteínas, principalmente debido a su alta sensibilidad, velocidad y requisitos de tamaño de muestra pequeños.

Los espectrómetros de masas por lo general poseen siete componentes principales: una entrada de muestra, una fuente de iones, un analizador de masas, un detector, un sistema de vacío, un sistema de control del instrumento, y un sistema de datos. La entrada de muestra, fuente de iones y analizador de masas tienden a definir el tipo de instrumento y capacidades del sistema. Los instrumentos más ampliamente utilizados en el análisis de péptidos de la leche se componen de combinaciones de entradas, fuentes de iones y analizadores de masas, para producir cuatro tipos diferentes de configuraciones:

- 1.- HPLC - electrospray - cuadrupolo espectrómetro de masas.
- 2.- Espectrómetro de masas de trampa - electrospray de iones de HPLC.
- 3.- HPLC - electrospray - cuadrupolo - tiempo de vuelo espectrómetro de masas.
- 4.- Laser de desorción de sonda directa asistida por matriz/ ionización de tiempo de vuelo espectrómetro de masas (MALDI- TOF)(Yan et al. 2016).

### **IV.VI.I. Espectrometría de masas en Tándem (MS/ MS)**

El análisis de masas se basa esencialmente en la separación de iones de acuerdo con su  $m/z$ . Los espectrómetros de masas tándem utilizan esta separación como una herramienta preparativa para aislar un ión con una  $m/z$  específico para ser fragmentado, de modo que el  $m/z$  de los fragmentos de iones será determinado en una segunda etapa del análisis de masas. El término "espectrometría de masas en tándem" (MS/ MS) indica que dos etapas de análisis de masas se utilizan en un solo experimento. El resultado es que los iones específicos en una

mezcla compleja pueden ser estudiados de manera selectiva en un experimento que da información estructural. En el caso de los iones de péptidos, la información estructural es la secuencia de aminoácidos del péptido. La fragmentación de los iones es impulsado por un exceso de energía interna, capaz de romper los enlaces covalentes para generar especies iónicas y neutras. Las especies iónicas se conocen como iones de productos o iones de fragmentos. El método más comúnmente utilizado para energizar un ion estable, después de que ha sido seleccionada para inducir reacciones de fragmentación, es la activación de colisión. En este método, el ion seleccionado en serie se transmite a una región de alta presión del espectrómetro de masas en tándem donde se somete a una serie de colisiones con las moléculas de gas contenidas en esa región. Estas colisiones hacen las reacciones de fragmentación inestables y de accionamiento de iones. Finalmente, los iones de fragmentos resultantes se analizan en la segunda etapa de análisis de masas (Yan et al. 2016).

Una forma de clasificar los espectrómetros de masas en tándem es de acuerdo a cómo se lleva a cabo el experimento: en tándem en el espacio o en tándem en el tiempo. Instrumentos en la categoría "tándem en el espacio" están compuestos por más de un analizador de masas que realizan por separado para llevar a cabo las diferentes etapas del experimento. Estos instrumentos son, por ejemplo, en tándem cuadrupolo (espectrómetro de masas de triple cuadrupolo); cuadrupolares en tiempo de vuelo (QTOF); reflectrón tiempo de vuelo; sector en tándem y sector cuadrupolo. Los instrumentos que llevan a cabo la espectrometría de masas en tándem en el tiempo sólo tienen un analizador de masas. Un analizador de masas de trampa de iones y una resonancia de ciclotrón de iones (también conocido como *Fourier Transform*).

#### **IV.VI.II. RP- HPLC (MS/ MS)**

En la presente investigación se lleva a cabo RP-HPLC (MS/ MS) o secuenciación N-terminal de los aminoácidos o su actividad biológica, de modo que se puede determinar la presencia o la formación y la degradación cinética de péptidos específicos.

La utilización de fase reversa (RP) es uno de los medios más populares de análisis de péptidos de la leche, debido a que estos péptidos están en un intervalo de polaridad que les permite estar bien separados en una fase octadecil-enlazada, utilizando como eluyentes tampones acuosos con un agua -miscible disolvente. Sin embargo, en algunos casos, ciertos péptidos pueden presentar una baja retención en envases RP.

La fase reversa en HPLC se utiliza para para confirmar la identidad de las proteínas, determinar el perfil de impurezas y cuantificar las modificaciones postransduccionales. La técnica separa los elementos basándose en las diferencias en hidrofobicidad y utiliza

condiciones de desnaturalización. De esta forma, se consigue información sobre la secuencia de aminoácidos primarios de la molécula, así como las variaciones y modificaciones de la secuencia (Arroyo Castellon et al. 2013). La mayoría de investigaciones otorgan al acoplamiento de HPLC a un espectrómetro de masas como la mejor técnica recomendada para la caracterización de péptidos de suero de leche.

#### **IV.VII. PÉPTIDOS BIOACTIVOS PREVIAMENTE DESCRITOS**

Desde su descubrimiento, en 1979, se han descrito péptidos bioactivos con diferentes actividades biológicas derivados de las principales proteínas de suero de leche  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina. En términos generales, dependiendo de la secuencia de aminoácidos en el péptido, su administración oral podría afectar alguno de los principales sistemas del organismo: cardiovascular, nervioso, gastrointestinal e inmune. Es decir, que la actividad biológica está relacionada con la composición y secuencia de los aminoácidos que los conforman.

Se han obtenido péptidos antihipertensivos a partir de proteínas de distintos alimentos de origen animal y vegetal. Los principales estudios son de péptidos antihipertensivos que provienen de proteínas lácteas de suero bovino.

##### **IV.VII.I. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de suero de leche**

Los hidrolizados de proteínas de suero lácteo han mostrado efectos beneficiosos para el control de la presión arterial. En este contexto, se ha demostrado que el consumo de 20 g/día de un hidrolizado de proteínas de suero lácteo, durante 6 semanas, reduce significativamente la PAS (presión arterial sistólica) y la PAD (presión arterial diastólica) en pacientes prehipertensos sin medicar. Este producto se comercializa actualmente en Estados Unidos con el nombre de "Biozate" (Aleixandre, Miguel and Muguerra 2008). El principal mecanismo implicado en el efecto de los péptidos antihipertensivos de origen alimentario, y también en el efecto de los péptidos lácteos anteriormente mencionados, es la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Ambas secuencias, VPP e IPP, se caracterizaron como potentes inhibidoras de la ECA.

Recientemente, se han identificado dos péptidos con una potente actividad inhibidora de la ECA derivados de la  $\beta$ -Lactoglobulina de la leche de cabra. Estos péptidos, que

corresponden a las secuencias Leu-Gln- Lys-Trp (LQKW) y Leu-Leu-Phe (LLF), se liberan tras la incubación de suero lácteo con termolisina, a 37 °C, durante 24 horas. Ambas secuencias mostraron efectos antihipertensivos en ratas SHR, cuando se administraron en dosis única, por vía oral, a estos animales (Aleixandre et al. 2008). De acuerdo a la evidencia acumulada hasta el momento, los péptidos que muestran actividad inhibidora de la ACE poseen residuos hidrofóbicos, tales como triptófano (Trp), tirosina (Tyr) o fenilalanina (Phe), en por lo menos una de las tres posiciones C-terminales con los cuales se unen a los sitios activos de la ACE, bloqueando su actividad. Se conoce también que secuencias de péptidos de cadena corta que portan residuos de prolina (Pro), en combinación o no con residuos hidrofóbicos, también tienen actividad inhibidora de la ACE. Adicionalmente, la potencia inhibidora se puede incrementar con la presencia, en esta posición terminal, de las cargas positivas de Lys (grupo amino) y Arg (grupo guanidino). En general, se reconoce que con respecto al peso molecular, los péptidos cortos (< 3 kDa) ofrecen consistentemente una mayor actividad inhibidora de la ACE (Alvarado Carrasco and Guerra 2010).

Se han obtenido cuatro potentes péptidos inhibidores de la ACE a partir de un hidrolizado de  $\alpha$ -lactoalbúmina catalizado con termolisina, todos ellos contenían la misma secuencia Pro-Glu-Trp en su extremo C-terminal. Así mismo, en un estudio realizado con la  $\beta$ -Lactoglobulina se identificó un tetrapéptido conformado por los residuos de aminoácidos Ala-Leu-Pro-Met f (142-145) al cual denominaron “b-lactosina B” para distinguirla del péptido “b-lactosina A” proveniente del f (78-80), previamente identificado en la misma proteína. La b-lactosina B mostró una fuerte actividad hipotensiva al ser administrada por vía oral a ratas espontáneamente hipertensivas (SHR), efecto atribuido por los autores al residuo de prolina presente en el tetrapéptido. En general, se ha encontrado que calentando la  $\beta$ -Lg durante los tratamientos enzimáticos (60 a 80°C) se favorece la formación de péptidos con actividad inhibidora de la ACE, y como un ejemplo de esto se menciona al fragmento Leu-Glu-Lys-Trp obtenido bajo estas condiciones y que ha sido descrito como un potente inhibidor ACE (Alvarado Carrasco and Guerra 2010).

#### **IV.VII.II. Péptidos opioides derivados de proteínas de suero de leche**

Receptores opioides, localizados en el sistema endocrino nervioso y en el tracto digestivo de mamíferos, están vinculados con el control de la motilidad intestinal, comportamiento emocional, analgesia y saciedad. Dichos receptores interactúan con ligandos endógenos (endorfinas) o exógenos (exorfinas) conocidos como péptidos opioides, los cuales tienen actividades agonísticas o antagonísticas; todos ellos tienen en común la presencia de un

residuo Tyr en la posición N-terminal, junto con la presencia de otro residuo aromático, como Phe o Tyr, en la tercera o cuarta posición (Alvarado Carrasco and Guerra 2010).

Se estudió el efecto de dos tetrapéptidos,  $\alpha$ -lactorphin (Tyr-Gly-Leu-Phe) y b-lactorphin (Tyr-Leu-LeuPhe), correspondientes a las secuencias de aminoácidos 50-53 de la  $\alpha$ -lactoalbúmina y 102-105 de la  $\beta$ -lactoglobulina, respectivamente, liberadas mediante proteólisis enzimática con pepsina y tripsina. Ambos tetrapéptidos se unen a receptores opioides y muestran una débil actividad opioide in vitro. Se demostró que ambos tetrapéptidos mejoraron la relajación dependiente del endotelio in vitro en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), pero no en ratas normotensivas (WKY). Se demostró, entonces, que los péptidos derivados del lactosuero realmente no tienen un efecto opioide como tal, sino que su interacción con receptores opioides tiene efecto vasodilatador, reduciendo así la presión arterial (Carrasco and Guerra 2010).

#### **IV.VII.III. Péptidos antioxidantes derivados de proteínas de suero de leche**

Los radicales libres causan en un producto alimenticio la oxidación de lípidos, desarrollando rancidez y reduciendo la vida útil del alimento; en los consumidores de productos que los contienen, los radicales libres modifican el ADN, proteínas y otras pequeñas moléculas celulares, pudiendo así jugar un papel significativo en el desarrollo de enfermedades. Péptidos antioxidantes son aquellos péptidos, de 4 a 20 kDa, que tienen la habilidad de inhibir los daños causados por la oxidación lipídica. Esta habilidad parece estar relacionada con la presencia de ciertos residuos de aminoácidos, tales como tirosina, metionina, histidina, lisina y triptófano, los cuales pueden quelar iones metálicos pro-oxidantes, capturar radicales libres y/o extinguir el oxígeno reactivo. Estudios recientes han demostrado que después de la hidrólisis, ciertos péptidos resultantes pueden actuar como antioxidantes en sistemas modelo, pudiendo ser empleados como antioxidantes naturales en productos alimenticios (Carrasco and Guerra 2010). Se ha demostrado que en un hidrolizado de proteína de suero están presentes péptidos tanto antioxidantes como pro-oxidantes, por lo que el efecto esperado como antioxidante se ve reducido por el efecto antagonista de ambos compuestos. Hasta la fecha, solo unos pocos péptidos antioxidantes han sido identificados en productos lácteos fermentados. La fracción con péptidos en el rango de 0,1 a 2,8 kDa ha mostrado en estudios un efecto reductor de radicales libres significativamente mayor que las otras fracciones con péptidos de mayor tamaño.

#### **IV.VII.IV. Péptidos antimicrobiales derivados de proteínas de suero de leche**

Estos péptidos están constituidos por cadenas cortas de aminoácidos con características hidrofóbicas y carga positiva, lo que les permite alterar la bicapa lipídica de los microorganismos, causando una modificación similar a la producida por las proteínas de canal, lo cual conlleva a la muerte de la célula debido a la pérdida de iones y sustancias metabólicas. La lactoferrina presente en el lactosuero siempre se ha reconocido como la proteína antimicrobiana de la leche; estudios recientes han reportado la generación de un potente péptido bactericida generado por degradación de la lactoferrina con pepsina, denominado lactoferricina B, efectivo contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Investigaciones recientes muestran otro fragmento designado como lactoferrampina, f (268-284) de la lactoferrina, el cual posee actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. De igual forma, se han descrito otros péptidos originados a partir de la hidrólisis de otras proteínas u oligopéptidos del lactosuero, como la Kappacina, fragmento f(138-158) del glicomacropéptido, caracterizado por poseer un residuo fosforilado de serina (Ser) y por acumularse sobre la membrana celular formando un poro aniónico, lo que lo hace un potente péptido antibacterial contra bacterias Gram-positivas (*Streptococcus mutans*) y Gram-negativas (*Pseudomonas gingivalis* y *E. coli*). La digestión con tripsina de la  $\beta$ -Lactoglobulina y de la  $\alpha$ -Lactalbúmina, genera respectivamente, cuatro y dos péptidos con efecto antimicrobiano contra bacterias Gram-positivas (Carrasco and Guerra 2010).

#### **IV.VII.V. Péptidos antitrombóticos derivados de proteínas de suero de leche**

Una complicación relacionada con enfermedades cardiovasculares es la tendencia a formar trombos debido a anomalías en la coagulación, lo cual ha sido asociada con hiperactividad plaquetaria, altos niveles de proteínas hemostáticas (fibrinógeno), fibrinólisis defectiva e hiperviscosidad de la sangre. Los péptidos antitrombóticos pueden inhibir la agregación plaquetaria debido a la analogía de su estructura con el fragmento 400-411 de la cadena g del fibrinógeno ; de esta forma el péptido inhibe la unión del fibrinógeno con su receptor plaquetario, lo cual de otra forma estimularía la agregación plaquetaria dando origen así a la fibrina responsable de la formación de trombos. Se han derivado péptidos antitrombóticos a partir del glicomacropéptido, reportándose la inhibición de la agregación plaquetaria (Alvarado Carrasco and Guerra 2010).



#### **IV.VII.VI. Péptidos inmunomoduladores derivados de proteínas de suero de leche**

Estos péptidos pueden jugar un papel importante en la modulación de la respuesta inmunológica, estimulando la fagocitosis en macrófagos y la proliferación de linfocitos. Se han propuesto diversas hipótesis para explicar la acción de estos péptidos, una de ellas propone la estimulación de la proliferación y maduración de células T y otras células fagocíticas para la defensa contra infecciones. Se ha demostrado que varios componentes lácteos modulan la proliferación in vitro de linfocitos, por ejemplo, la lactoferricina B promueve la actividad fagocítica de los neutrófilos humanos; pequeños péptidos derivados del extremo N-terminal de la  $\alpha$ -lactalbúmina bovina aumentan significativamente la proliferación de linfocitos sanguíneos periféricos humanos. Sin embargo, el mecanismo por el cual estos péptidos ejercen su efecto inmunopotenciador no se conoce en la actualidad; en principio se ha propuesto que estos péptidos podrían interactuar con el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal. Se ha encontrado evidencia de que algunos péptidos de cadena corta (<5kDa) obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática de las proteínas del suero, estimulan la proliferación de las células del sistema inmunológico (Alvarado Carrasco and Guerra 2010).

En la actualidad, los péptidos bioactivos obtenidos a partir del suero, son constituyentes fundamentales de algunos productos comercializados como “Alimentos Funcionales” o “Nutraceúticos”, en los cuales son añadidos o enriquecidos modificando los procesos usuales de manufactura. Se puede considerar al suero de leche enriquecido con péptidos bioactivos como un ingrediente funcional. Se han encontrado una variedad de péptidos naturalmente formados en productos lácteos fermentados, tales como yogurt, crema agria y queso, cuyo beneficio para la salud no ha sido establecido, además, existen ya en el mercado productos lácteos complementados con péptidos bioactivos derivados de la leche cuyos efectos sobre la salud han sido documentados en estudios clínicos humanos. Un ejemplo de esto son los productos lácteos fermentados registrados como CALPIS®, comercializado en Japón, y EVOLUS®, comercializado en Finlandia, los cuales contienen péptidos con actividad antihipertensiva comprobada (Carrasco and Guerra 2010).

## V. OBJETIVOS

El objetivo general se centra en evaluar la composición peptídica de hidrolizados de distintos concentrados proteicos obtenidos en condiciones que simulan la digestión gástrica con pepsina.

Para lograr el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Obtención de hidrolizados gástricos.
- Determinación de la degradación proteica mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de agentes desnaturizantes (SDS-PAGE)
- Determinación del grado de hidrólisis con el tiempo de digestión.
- Identificación de los péptidos generados mediante HPLC-MS/MS.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.I. MUESTRAS

Se utilizaron tres concentrados de proteína de suero lácteo bovino (WPC): dos de ellos enriquecidos en diferentes proporciones con las proteínas principales  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina y un tercer concentrado que contiene las proporciones naturales de las proteínas del suero lácteo bovino.

El WPC enriquecido con  $\beta$ -lactoglobulina corresponde al producto comercial HIPROTAL 80BL que contiene un 80% de proteína (lote número: 635662, fecha de elaboración: 16/02/2014). Mientras que, el WPC enriquecido con  $\alpha$ -lactoalbúmina corresponde al producto comercial LACPRODAN ALPHA-20 que contiene un 90% de proteína (lote número: F370260 fecha de elaboración: 12/02/2016). Finalmente, el WPC sin enriquecimiento corresponde al producto comercial PRODIET 85 S que contiene 80% de proteína (lote número: 00377, fecha de elaboración: 15/08/2015).

### VI.II. FLUIDOS DIGESTIVOS SIMULADOS (SSF Y SGF)

Cada muestra se disolvió en 20 mL de fluido salivar simulado (SSF) y en 20 mL de fluido gástrico simulado (SGF) para obtener una concentración final de 30 mg de proteína/mL. Los fluidos simulados se prepararon a partir de unas soluciones stock (Tabla 4 de la sección de introducción), según proponen Minekus y col. (2014). La Tabla 5 a continuación muestra la preparación de los fluidos salivar y gástrico a partir de las soluciones stock.

Tabla 6 "Volúmenes de trabajo final de los fluidos simulados de digestión"

<b>SSF<sub>preparado</sub></b> <b>(Simulated Salivary Fluid, Fluido Salivar Simulado) (pH 3)</b>		<b>SGF<sub>preparado</sub></b> <b>(Simulated Gastric Fluid, Fluido Gástrico Simulado) (pH 3)</b>	
<b>Solución añadida</b>	<b>mL</b>	<b>Solución añadida</b>	<b>mL</b>
<b>SSF<sub>stock</sub></b>	15mL	<b>SGF<sub>stock</sub></b>	15,50 mL

SSF <sub>preparado</sub> ( <i>Simulated Salivary Fluid, Fluido Salivar Simulado</i> ) (pH 3)		SGF <sub>preparado</sub> ( <i>Simulated Gastric Fluid, Fluido Gástrico Simulado</i> ) (pH 3)	
HCl 2M (para ajuste de pH)	100 µL	HCl 2M (para ajuste de pH)	250 µL
CaCl <sub>2</sub> 0.3M	50µL	CaCl <sub>2</sub> 0.3M	10µL
H <sub>2</sub> O	4.85mL	H <sub>2</sub> O	3.74mL
Volumen total SSF <sub>preparado</sub> = 20 mL		Volumen total SGF <sub>preparado</sub> = 20 mL	

### VI.III. DIGESTIÓN IN VITRO CON PEPSINA

Para llevar a cabo la digestión con pepsina se usó una concentración de 30 mg de proteína/mL de fluidos digestivos simulados y se usó un volumen final de 40mL. La digestión de cada una de las muestras se llevó a cabo por duplicado utilizando pepsina como enzima de acuerdo al siguiente esquema:

Figura 5 "Esquema de digestión in vitro para concentrados de proteínas de suero de leche (WPC)"

#### "Esquema de digestión in vitro para concentrados de proteínas de suero de leche (WPC) + pepsina"



Primero, se pesaron 16.34 mg de pepsina de origen porcino (EC 3.4.23.1, Sigma Aldrich, 2938 U/mg de proteína, lote nº128K7354) que se disolvieron en 600 µL de SGF segundos antes de empezar el proceso de digestión. Para empezar la digestión, se añadió la enzima disuelta, a la muestra de concentrado de proteína de suero diluida en los fluidos simulados. La hidrólisis se llevó a cabo bajo agitación controlada (100 rpm) a una temperatura de 37°C durante 2 horas. Durante la digestión, se tomaron 5 mL de muestra a los tiempos de 0, 10, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos; en las cuales, se inactivó la enzima aumentando el pH a 7 con NaOH 2 N y las muestras se enfriaron rápidamente en hielo. Al finalizar la digestión, se centrifugaron las muestras a 9072 G por 10 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante separándolo en 3 tubos de 1.5mL. Finalmente, las muestras se congelaron y se almacenaron a -20°C.

En cada tiempo de digestión, también se tomaron alícuotas de 150µL de cada muestra antes de inactivar la enzima y se diluyeron con 850uL de agua. De esta solución, se tomaron 100 µL y se añadieron 300 µL de tampón con agentes desnaturizantes y reductores (4% SDS, 20% glicerol, 0.004% bromofenol azul, 0.125M Tris HCl y 10% 2-mercaptoetanol añadido el mismo día de cada digestión), para obtener una concentración final de proteína de 1,5 mg/mL. Inmediatamente, se calentaron los tubos a 95°C en un termobloque por 5 minutos con agitación y se colocaron las muestras en hielo. Estas alícuotas se utilizaron para el análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de agentes desnaturizantes (PAGE-SDS).

#### **VI.IV. LIOFILIZACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS**

Se liofilizaron todas las muestras obtenidas de las dos hidrólisis a condiciones de vacío a 0.330 mBar y una temperatura de condensación de cámara de -87.4°C por 72 horas. Después de la liofilización, se homogeneizaron las muestras en polvo y almacenaron en ultracongelación a -20°C para su posterior análisis.

#### **VI.V. PRUEBAS ANALÍTICAS**

##### **VI.V.I. Electroforesis en gel (SDS-PAGE)**

Las muestras tomadas a los diferentes tiempos de la hidrólisis de los distintos concentrados de proteínas de suero lácteo se analizaron electroforéticamente con el objetivo de vigilar la degradación proteica frente al tiempo de hidrólisis. La electroforesis en gel SDS-PAGE (dodecil sulfato de sodio-gel de poliacrilamida) permite separar las proteínas presentes

en la muestra en función de su peso molecular. De esta manera, se pudo seguir la degradación de las proteínas presentes en el suero lácteo por la acción hidrolítica de la pepsina (Benítez, Ibarz Ribas and Pagan i Gilabert 2008).

Para la separación se utilizó el gel comercial “Precast Get Criterion XT 4-12% Bis- Tris” de 12 pocillos de capacidad para 45µL de muestra por pocillo. Las muestras analizadas contenían una concentración de 1,5 mg/mL en base a su contenido en proteína en tampón de tratamiento de la muestra descrito en la sección de la digestión in vitro. En cada pocillo se cargaron 40 uL de cada muestra de los diferentes tiempos de hidrólisis y 10 µL del marcador proteico “Precision Plus Protein Unstain Standard” (cat. Nº 161- 0363) constituido por proteínas de 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 kDa. La separación electroforética se llevó a cabo durante 1 h 15 min a 150V de cuales los primeros 5 minutos la corriente se mantuvo a 100V.

Los geles se tiñeron con colorante azul de Coomasie G-250 Biosafe de Biorad. Posterior al lavado de los geles, se realizó la captura de imágenes con el lector Versadoc Imaging System también de Biorad que posee una cámara fotográfica de objetivo AF 28-80 mm. Durante la realización del enfoque previo del objetivo, se configuró el software del equipo Versadoc para la captura de la imagen del gel con 0.3 segundos de duración.

#### **VI.V.II. Grado de Hidrólisis (TNBS)**

Se evaluó el grado de hidrólisis como parámetro para el control de la reacción enzimática. Para este proceso se utilizó el protocolo basado en la reacción con ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS) de la marca Sigma-Aldrich. El propósito de este ensayo fue medir la proporción grupos amino libres mediante la reacción con TNBS. Se midió la absorbancia de esta reacción a 410nm. Previa a la medición del grado de hidrólisis de cada una de las muestras, se estandarizó una curva patrón de la reacción con una solución stock de L-leucina 2mM (cat. nº 200-522, lote 77H0704 de Sigma-Aldrich). Se midió el grado de hidrólisis de las muestras una vez alcanzada una exactitud >0.9700 del valor R<sup>2</sup> de las gráficas obtenidas de la curva patrón con leucina. El grado de hidrólisis se calculó de acuerdo a la ecuación  $GH = (h/h_{tot}) \cdot 100\%$ , donde  $h$  es el número de enlaces peptídicos hidrolizados y  $htot$  el número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína nativa. Ambos,  $h$  y  $htot$  son expresados en meq/g (Benítez et al. 2008).

Se preparó una placa Costar de 96 pocillos con 10 µL la muestra a una concentración de 2mg/mL y 10µL de la solución stock de leucina a las diferentes concentraciones de la curva de calibración. Cada muestra se ensayó por triplicado. Las muestras son incubadas con tampón borato (NaBO<sub>2</sub>) y ácido picrilsulfónico al 0.2% por 30 minutos a temperatura ambiente. Tras

este tiempo la reacción se para mediante la adición de sulfito de sodio 18mM en fosfato monobásico de sodio 2M. Posteriormente, se leyeron los resultados en lector de placas, modelo FLUOstar OPTIMA marca BMG LABTECH.

El método TNBS es antiguo y fiable, sin embargo posee algunas observaciones realizadas por autores de algunas publicaciones. Entre los inconvenientes de este método pueden mencionarse: la inestabilidad del reactivo, el riesgo de explosión, el alto valor de los blancos, la contaminación del reactivo con ácido pícrico, la interferencia de azúcares reductores y amonio, la no reactividad de prolina e hidroxiprolina; así como también, la alteración de los resultados por la reacción de los grupos amino de lisina con el reactivo.

### **VI.V.III. Determinación de proteína (BCA)**

El contenido de proteína de los hidrolizados se determinó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) empleando el kit comercial de Pierce de la marca Thermo Scientific. Siguiendo el protocolo, se preparó el reactivo A (carbonato y bicarbonato sódico) y tartrato sódico en una solución de hidróxido de sodio 0.1M. Paralelamente, se preparó el reactivo B (compuesto de sulfato cúprico al 4%) y se mezclaron el reactivo A con el reactivo B en una proporción 50:1 respectivamente (Scientific 2007).

Previa a la preparación de las muestras, se realizó una curva patrón de calibrado con la proteína seroalbúmina bovina (BSA) en dilución seriada a diferentes concentraciones: 1000, 750, 500, 250, 125 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A continuación, se preparó una placa Costar de 96 pocillos en la que se colocaron 25 $\mu\text{L}$  de muestra por triplicado de cada concentración de la curva patrón y 25 $\mu\text{L}$  de muestra de los hidrolizados también por triplicado. Después, se añadió a cada pocillo 200 $\mu\text{L}$  de reactivo BCA, se incubó 30 minutos a 37°C y se leyó la absorbancia de la placa a 570nm utilizando lector de placas, modelo FLUOstar OPTIMA marca BMG LABTECH.

### **VI.V.IV. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC MS/MS)**

Para la identificación de los péptidos presentes en los diferentes hidrolizados de los concentrados de  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina se utilizó un cromatógrafo líquido Agilent Technologies 1100 (HPLC) series acoplado a un espectrómetro de masas (MS) modelo Esquire 3000 de marca Bruker Daltonics. El proceso de separación se controló mediante el software Hystar 3.1, el cual controla el cromatógrafo de líquidos; y el programa Esquire Control, que es

el encargado de monitorizar el espectrómetro de masas. Ambos programas se mantuvieron abiertos para su continua configuración e inyección de las muestras.

Se empleó un volumen de inyección de 50 $\mu$ L a una temperatura de 30°C de análisis, flujo de 0.2 mL/min y una concentración de la muestra de 1 mg/mL. La muestra utilizada se trató previamente con 1,4-ditiotreitol (DTT) para reducir los puentes disulfuro presentes en las proteínas de suero. Para ello, la muestra en fase móvil (ácido fórmico 0.1% en agua ultrapura tipo I) más un volumen equivalente 1:1 de la solución de DTT 140mM. Finalmente, cuando se obtiene la muestra a la concentración deseada y una concentración de DTT 70 mM, se ajusta el pH a 7, o ligeramente superior, y se incuba 1 hora en un termobloque a 37°C.

Inmediatamente, antes de colocar las muestras en el HPLC MS/MS, se centrifugan las muestras a 18928 G durante 10 minutos para retirar partículas no disueltas. Tras la inyección de las muestras, los datos obtenidos se analizaron con el software Data Analysis v. 4 (Bruker, Daltoniks), para la observación de los cromatogramas y exportación de la información de separación y Biotools para llevar a cabo la búsqueda por MASCOT, usando una base de datos con las proteínas de suero bovino para la identificación de los péptidos constitutivos.



## VII. RESULTADOS

### VII.I. CONTROL DE LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON PEPSINA

Durante la reacción de hidrólisis se tomaron 5 mL de muestra a los tiempos de 0, 10, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos como se ha mencionado anteriormente. Tras la toma de muestras, se inactivó la pepsina en las muestras aumentando el pH a 7, o ligeramente superior con NaOH 2 M. Además, durante el proceso de hidrólisis enzimática, se realizó un ajuste de pH, mediante la adición de HCl 1 M a tiempos intermedios de: 0, 5, 15, 25, 45, 75 y 105 minutos. El ajuste fue necesario para mantener el sistema en pH 3 y de esta manera, favorecer la actividad de la pepsina. A modo de ejemplo, las siguientes tablas muestran el pH medido a cada tiempo y el pH fijado tras la adición de HCl, y el pH de las alícuotas obtenidas a cada tiempo y el pH que se utilizó para parar la reacción enzimática. La Tabla 6 corresponde a una hidrólisis con el WPC enriquecido en  $\beta$ -lactoglobulina, la Tabla 7 a la hidrólisis con el WPC sin enriquecer, y la Tabla 8 a la hidrólisis del WPC enriquecido en  $\alpha$ -lactoalbúmina.

De la Tabla 6 cabe destacar que durante el proceso de hidrólisis se produce un aumento del pH, lo que indica la progresión de la reacción enzimática y por tanto la producción de péptidos que producirían el aumento del pH observado. Sin embargo a partir de los 45 min no fue necesaria la adición de ácido para ajustar el pH de la reacción lo que sugiere una disminución de la progresión del proceso de hidrólisis. En la columna de inactivación de la enzima, se puede observar que en todas las alícuotas, el pH se fijó a valores superiores a 7 para asegurar la inactivación de la enzima. Se ha descrito que la pepsina tiene su actividad óptima a pH 2.0 y que es inactiva a pH superiores a 6.5 aunque volvería a estar activa al bajar el pH. A pH superiores a 8.0, la pepsina se desnaturaliza y se inactiva irreversiblemente (Johnston y col., 2007).

En la Tabla 7, que corresponde a la hidrólisis del WPC, se observa un comportamiento similar. El pH no necesitó ajustarse a todos los tiempos, indicando bien una menor progresión de la reacción enzimática o bien una menor capacidad tamponante de los péptidos formados. Igualmente, la Tabla 8, correspondiente a la hidrólisis del WPC enriquecido en  $\alpha$ -lactoalbúmina muestra cómo se requirió menor adición de ácido para mantener el pH que en el caso del WPC enriquecido en  $\beta$ -lactoglobulina, lo que probablemente se deba a una menor capacidad tamponante de los péptidos derivados de  $\alpha$ -lactoalbúmina.

Tabla 7 "Ajuste de pH e inactivación de pepsina durante la hidrólisis de las muestras de concentrado WPC enriquecido en  $\beta$ -lactoglobulina"

Tiempo	Ajuste de pH		Tiempo	Inactivación de la pepsina	
	pH inicial	pH final		pH inicial	pH final
T= 0	3.10	<b>3.03</b>	T= 0	3.09	<b>7.71</b>
T= 5	5.30	<b>2.95</b>	T= 10	2.90	<b>7.35</b>
T= 15	2.61	<b>3.05</b>	T= 20	3.08	<b>7.34</b>
T= 25	3.12	<b>2.96</b>	T= 30	2.95	<b>7.57</b>
T= 45	2.95	<b>2.95</b> <b>(No hay ajuste)</b>	T= 60	2.95	<b>7.38</b>
T= 75	2.95	<b>2.95</b> <b>(No hay ajuste)</b>	T= 90	2.91	<b>7.41</b>
T= 105	2.90	<b>3.01</b>	T= 120	3.02	<b>7.11</b>

*Tabla 8 "Ajuste de pH e inactivación de pepsina durante la hidrólisis de las muestras de concentrado WPC enriquecido con B-Ig y α-La"*

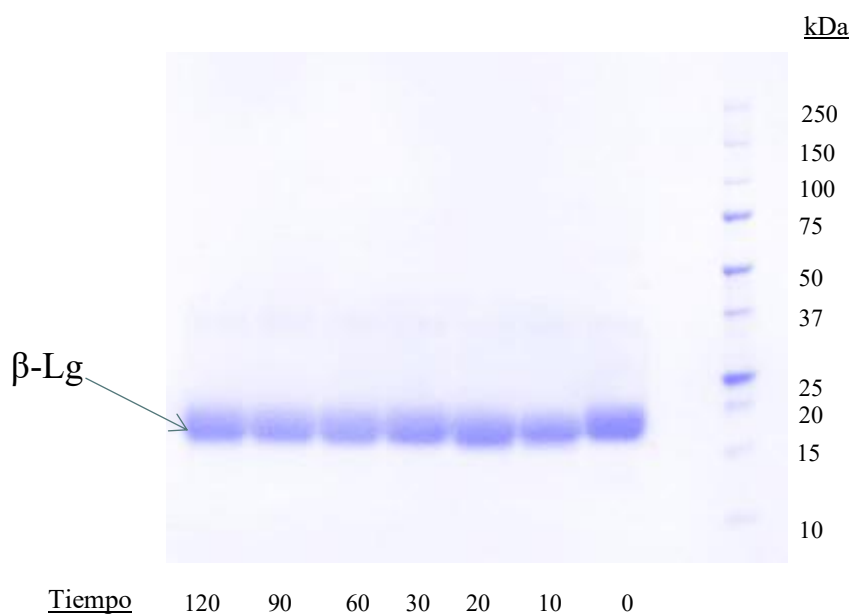
<b>Tiempo</b>	<b>Ajuste de pH</b>		<b>Tiempo</b>	<b>Inactivación de la pepsina</b>	
	<b>pH inicial</b>	<b>pH final</b>		<b>pH inicial</b>	<b>pH final</b>
T= 0	3.16	<b>2.97</b>	T= 0	3.16	<b>7.10</b>
T= 5	3.05	<b>3.05 (No hay ajuste)</b>	T= 10	3.10	<b>7.18</b>
T= 15	3.12	<b>2.97</b>	T= 20	3.01	<b>7.48</b>
T= 25	3.05	<b>3.05 (No hay ajuste)</b>	T= 30	3.11	<b>7.96</b>
T= 45	3.14	<b>2.98</b>	T= 60	2.98	<b>7.43</b>
T= 75	2.98	<b>2.98 (No hay ajuste)</b>	T= 90	3.00	<b>7.50</b>
T= 105	3.01	<b>3.01 (No hay ajuste)</b>	T= 120	3.02	<b>7.75</b>

Tabla 9 "Ajuste de pH e inactivación de pepsina durante la hidrólisis de las muestras de concentrado WPC enriquecido en  $\alpha$ -lactoalbúmina"

Tiempo	Ajuste de pH		Tiempo	Inactivación de la pepsina	
	pH inicial	pH final		pH inicial	pH final
T= 0	3.20	2.95	T= 0	3.20	7.25
T= 5	3.00	3.00 (No hay ajuste)	T= 10	3.01	7.80
T= 15	3.02	3.02 (No hay ajuste)	T= 20	3.04	7.30
T= 25	3.04	3.04 (No hay ajuste)	T= 30	3.06	7.30
T= 45	3.15	2.95	T= 60	3.00	7.20
T= 75	3.03	3.03 (No hay ajuste)	T= 90	3.05	7.80
T= 105	3.05	3.05 (No hay ajuste)	T= 120	3.08	7.40

## VII.II. DEGRADACIÓN PROTEICA MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

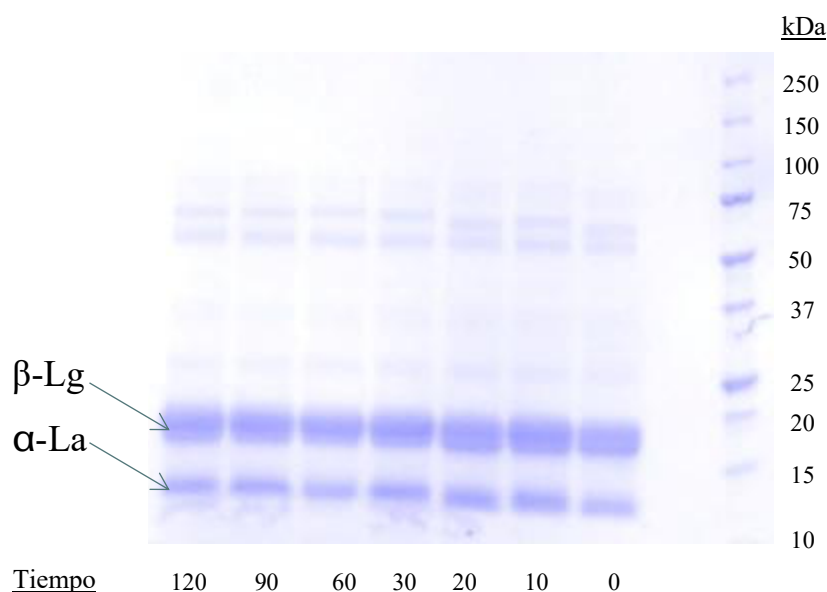
Para comprobar la actividad enzimática frente a los concentrados de proteína de suero lácteo, los hidrolizados se analizaron mediante SDS-PAGE, lo que permitió monitorizar la degradación proteica con el tiempo de hidrólisis. Las Figuras 8, 9 y 10 muestran los perfiles electroforéticos de las muestras correspondientes a los distintos tiempos de hidrólisis de cada concentrado proteico. En la Figura 8, que corresponde al WPC enriquecido en  $\beta$ -lactoglobulina se observa que el contenido en  $\alpha$ -lactoalbúmina en este concentrado es mínimo ya que no se aprecia una banda electroforética correspondiente a esta proteína en el tiempo inicial. Estudios anteriores de caracterización de este WPC llevados a cabo en el laboratorio, demostraron que el contenido en  $\beta$ -lactoglobulina era al menos del 99% respecto del contenido en proteína del producto (Martínez-Maqueda y col., 2013).



*Figura 6 "Perfil electroforético del concentrado de proteína de suero de leche WPC enriquecido con  $\beta$ -lactoglobulina"*

Además en la Figura 8, se observa una disminución de la intensidad de la banda electroforética correspondiente a la  $\beta$ -lactoglobulina, aunque al tiempo final (120 min) todavía permanece una cantidad importante de  $\beta$ -lactoglobulina sin digerir. Esto indica cierto grado hidrólisis de la  $\beta$ -lactoglobulina por acción de la pepsina. Se ha descrito que la  $\beta$ -lactoglobulina

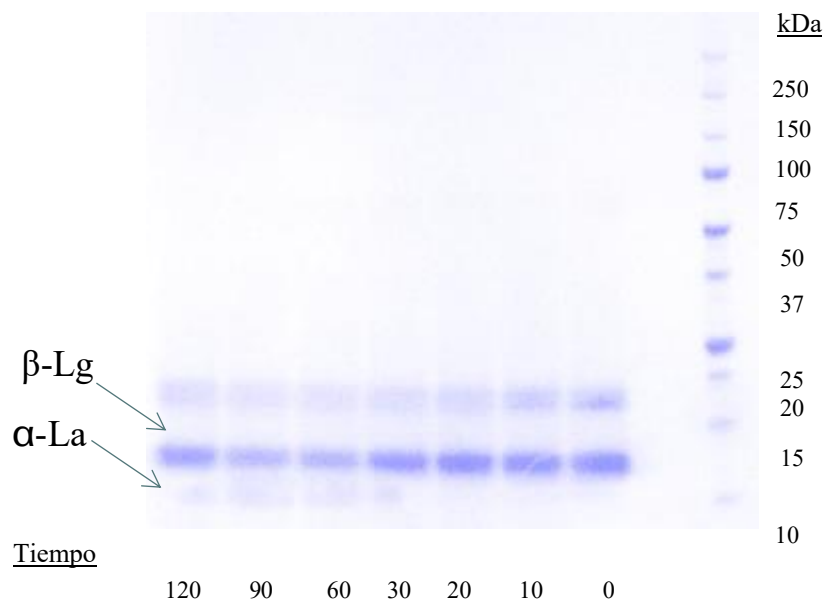
es resistente a la acción de la pepsina, y por ello, se considera que esta proteína es estable en condiciones gástricas (Dalgalarondo y col., 1995). Sin embargo, se ha observado que durante el procesado, p.e. el tratamiento térmico, se producen modificaciones en la estructura proteica que dan lugar a cambios en la susceptibilidad de las proteínas a la digestión enzimática. En concreto, en el caso de la  $\beta$ -lactoglobulina, aumenta la susceptibilidad a la hidrólisis por pepsina tras tratamientos térmicos a 90°C, y se ha observado que la digestibilidad de la  $\beta$ -lactoglobulina desnaturalizada depende de la relación enzima/sustrato y del tipo de agregado o el grado de desnaturalización (Peram et al. 2013). En la producción de WPC, el suero de quesería es sometido a tratamientos térmicos (pasterización) previo a los tratamientos por membrana para su enriquecimiento en proteína, además de un proceso de secado final por atomización, por lo que es lógico que  $\beta$ -lactoglobulina presente en el producto analizado tenga cierto grado de desnaturalización y sea parcialmente hidrolizado por acción de la pepsina.



*Figura 7 "Perfil electroforético del concentrado de proteína de suero de leche WPC con proteínas de suero de leche en sus proporciones naturales"*

La Figura 9 muestra el perfil electroforético obtenido con los hidrolizados del WPC. Como es lógico, este producto presenta al tiempo inicial (sin hidrólisis enzimática) las bandas electroforéticas correspondientes a las proteínas,  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina. Además se observan otras bandas de mayor peso molecular, entre 50 y 75 kDa, probablemente debidos a agregados proteicos, o a proteínas minoritarias presentes en el suero lácteo como seroalbúmina bovina (66.382 Da). Durante el proceso de hidrólisis enzimática, se observa la disminución en la intensidad de las bandas correspondientes a las proteínas mayoritarias,  $\beta$ -

lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina, aunque al final del proceso de hidrólisis permanece una gran cantidad de proteína sin hidrolizar.



*Figura 8 "Perfil electroforético del concentrado de proteína de suero de leche WPC enriquecido con  $\alpha$ -lactoalbúmina"*

En el caso del WPC enriquecido en  $\alpha$ -lactoalbúmina (Figura 10), se observa a tiempo inicial el enriquecimiento en esta proteína respecto a la proteína mayoritaria en suero lácteo ( $\beta$ -lactoglobulina). La intensidad de ambas bandas disminuye con el avance de la hidrólisis enzimática, pero al igual que en los casos anteriores las proteínas de suero no son totalmente hidrolizadas en las condiciones utilizadas tras 120 min.

### VII.III. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

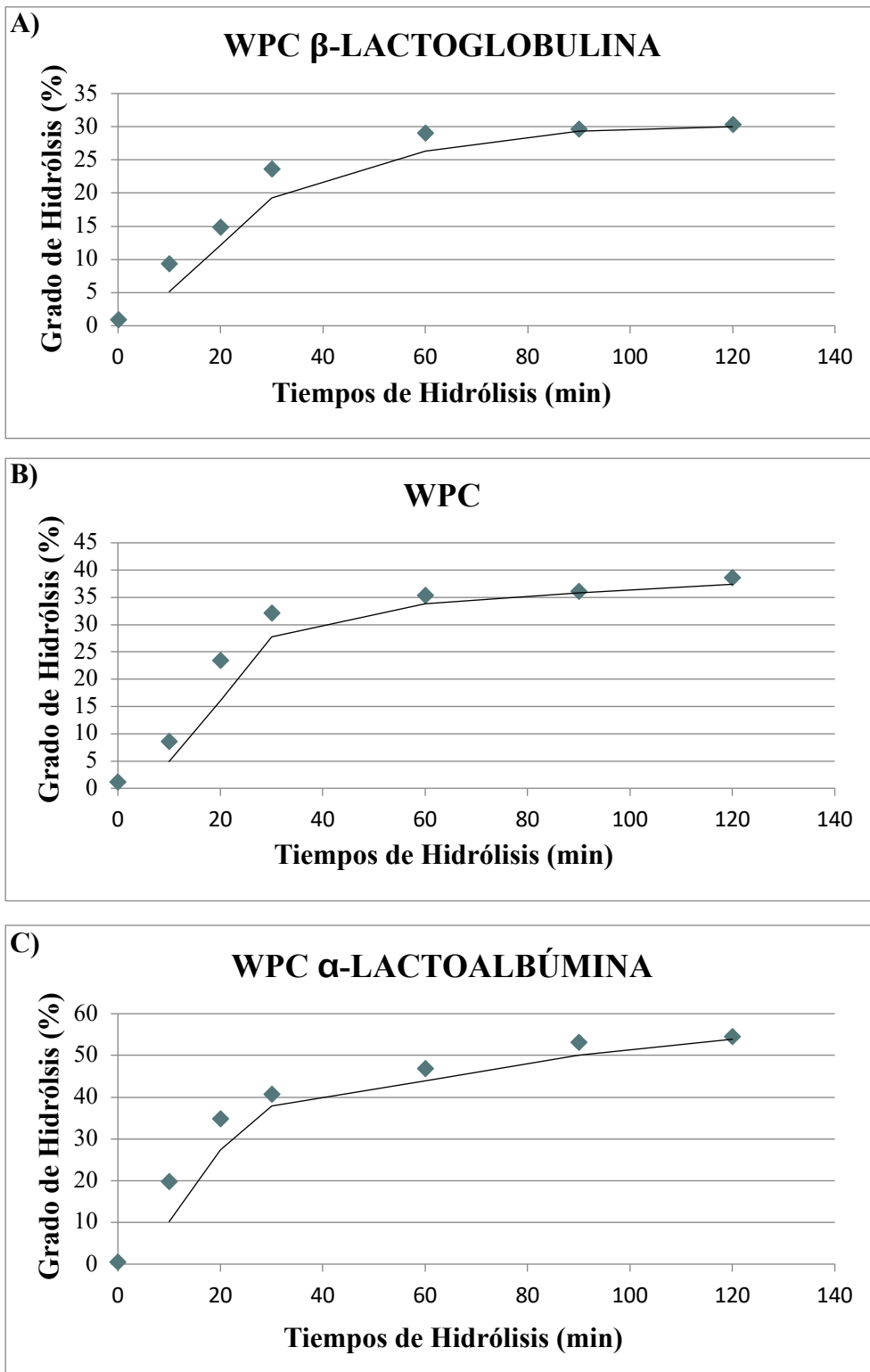


Figura 9 "Determinación del grado de hidrólisis a partir de los concentrados de proteína de suero: A) WPC enriquecido en  $\beta$ -lactoglobulina; B) WPC sin enriquecer y C) WPC enriquecido con  $\alpha$ -lactoalbúmina".



Se determinó el grado de hidrólisis de las distintas muestras obtenidas a lo largo del tiempo de hidrólisis de los tres concentrados WPC. Para ello, se empleó el método basado en la reacción de los grupos amino libres con el TNBS según se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los valores obtenidos para uno de los dos duplicados de digestión realizados con cada sustrato a lo largo del tiempo de hidrólisis se muestran en la Figura 11. Se observa un aumento del grado de hidrólisis con el tiempo muy rápido durante los 30 primeros minutos de hidrólisis para los tres sustratos. En el caso del WPC y el WPC enriquecido en  $\beta$ -lactoglobulina, aumenta ligeramente entre los 30 y 60 minutos para estabilizarse durante la segunda hora de hidrólisis (de 60 a 120 min). En el caso del WPC enriquecido en  $\alpha$ -lactoalbúmina, el grado de hidrólisis siguió aumentando ligeramente entre los 60 y los 120 min.

Si comparamos estos resultados con los resultantes de la medida del pH a lo largo del tiempo de hidrólisis, podemos decir que ambos métodos están de acuerdo en la ralentización de la progresión del proceso hidrolítico durante la segunda hora de hidrólisis. Sin embargo, los resultados de ambas medidas sobre el grado de hidrólisis no son totalmente coincidentes. En la medida del pH influye la capacidad tamponante de los péptidos generados durante la hidrólisis que puede ser distinta en función de la proteína hidrolizada. Otros autores también habían descrito la falta de correlación existente en distintos métodos para la determinación del grado de hidrólisis: TNBS, OPA y por valoración (Spellman et al. 2003). Estos autores concluyen que la determinación del grado de hidrólisis mediante TNBS es la más apropiada en el caso de las proteínas de suero lácteo.

#### VII.IV. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA

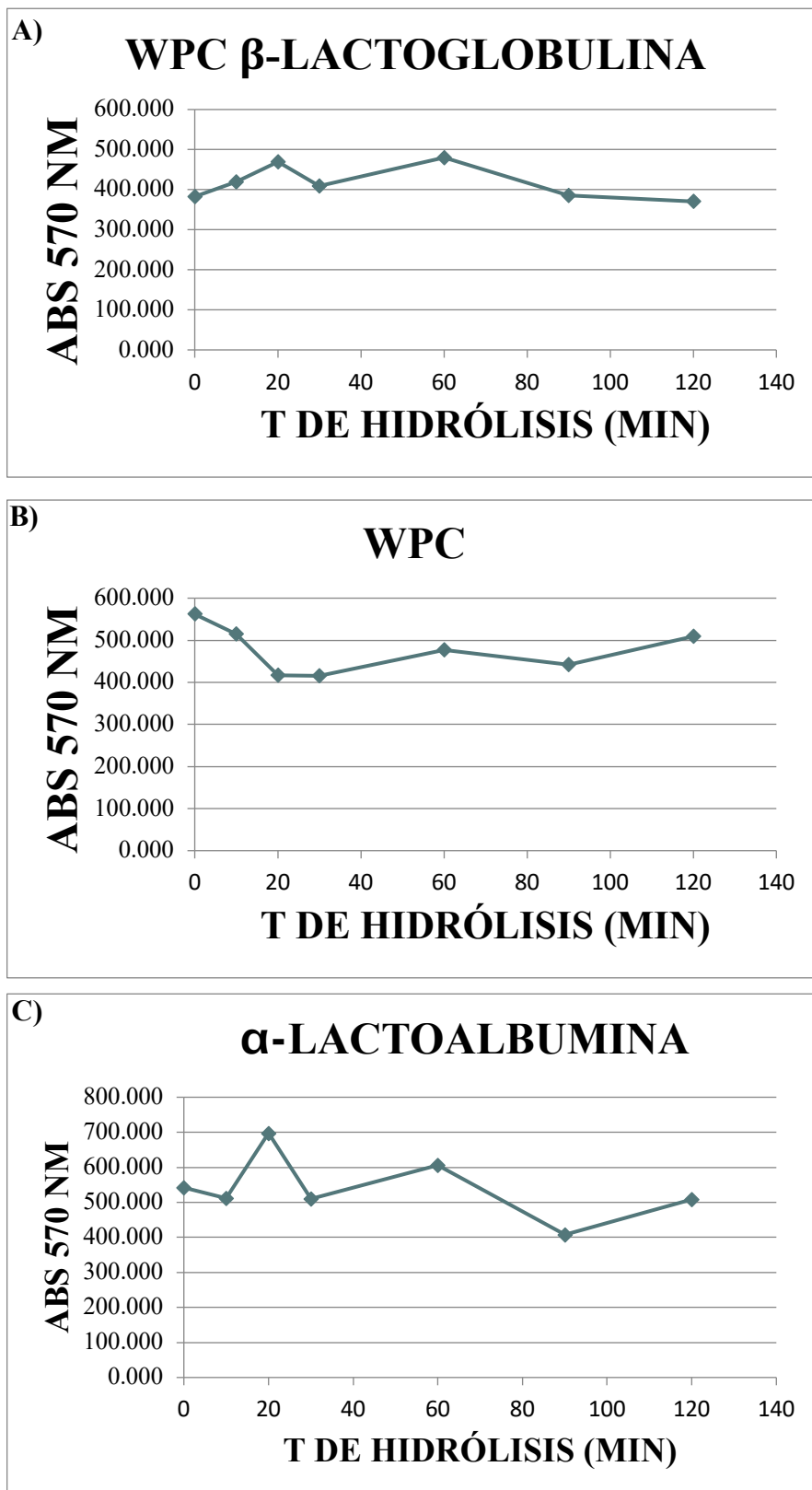


Figura 10 "Determinación de la concentración de proteína en los sobrenadantes obtenidos de la hidrólisis a partir de los concentrados de proteínas de suero: A) WPC enriquecido en  $\beta$ -lactoglobulina; B) WPC sin enriquecer; y WPC enriquecido en  $\alpha$ -lactoalbúmina"

En los sobrenadantes obtenidos tras la centrifugación de los hidrolizados, se determinó la concentración de proteína mediante el método del BCA empleando un kit comercial. Estos datos se usaron para el análisis posterior mediante HPLC-MS/MS. En la Figura 12 se muestran los valores obtenidos con el tiempo de hidrólisis para los hidrolizados de los tres sustratos. En general, se encontraron pocas diferencias con el tiempo de hidrólisis. Las diferencias observadas pueden deberse a la precipitación de las proteínas no hidrolizadas.

#### **VII.V. IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS DE LA $\beta$ -LACTOGLOBULINA Y $\alpha$ -LACTOALBÚMINA**

Para la identificación peptídica, se seleccionó de cada uno de los digeridos dos muestras con distinto grado de hidrólisis: 20 min y 120 min. Estos hidrolizados se analizaron mediante HPLC-MS/MS con el fin de identificar los péptidos que formaban parte de estos hidrolizados. Posteriormente, en el grupo de investigación se quiere estudiar algunas actividades biológicas que se estima pueden estar relacionadas con el tamaño de los péptidos.

Dado que las principales proteínas de suero lácteo tienen puentes disulfuro en su estructura (4 en el caso de la  $\alpha$ -lactoalbúmina, y 2 en el caso de la  $\beta$ -lactoglobulina), las muestras se trataron con un agente reductor (DTT) para romper los puentes disulfuro y facilitar la identificación peptídica. Se analizaron las muestras en un equipo de HPLC que cuenta con un detector ultravioleta (UV) fijado a 214 nm y que permite la detección del enlace peptídico. A este equipo se encuentra conectado un detector de masas en serie de trampa de iones con ionización de tipo electrospray. La Figura 13 muestra la señal obtenida por el detector UV, la corriente total de iones (TIC) obtenida en el detector de masas y un patrón de fragmentación para uno de los péptidos identificados que eluía en el minuto 23, todo ello correspondiente al análisis del digerido de 120 min del WPC enriquecido en  $\alpha$ -lactoalbúmina.

De la información contenida en el espectro de MS/MS de la fragmentación de cada uno de los iones se puede obtener la secuencia peptídica. A modo de ejemplo, la Figura 13C muestra el espectro de fragmentación del ión con una relación masa/carga ( $m/z$ ) 979,5 con carga +1. En el espectro de fragmentación son más abundantes los iones tipo b, debido a la presencia de un residuo de histidina en el extremo amino-terminal que se carga fácilmente. Además se observan pérdidas de agua (diferencias de 18 unidades) respecto de los iones mayoritarios lo que es compatible con la presencia de aminoácidos con grupos hidroxilo, como treonina.

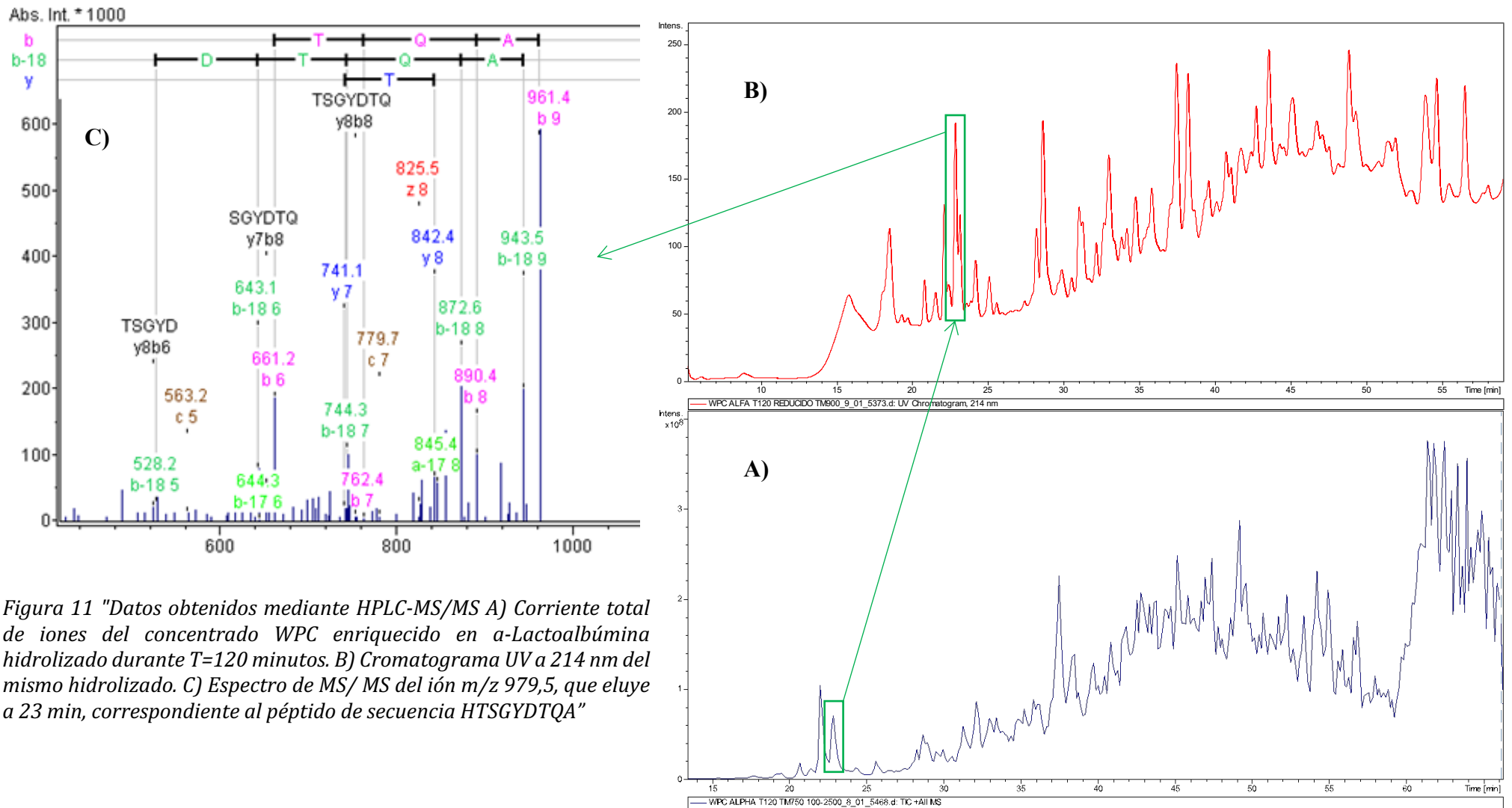


Figura 11 "Datos obtenidos mediante HPLC-MS/MS A) Corriente total de iones del concentrado WPC enriquecido en  $\alpha$ -Lactoalbúmina hidrolizado durante  $T=120$  minutos. B) Cromatograma UV a 214 nm del mismo hidrolizado. C) Espectro de MS/MS del ión  $m/z$  979,5, que eluye a 23 min, correspondiente al péptido de secuencia HTSGYDTQA"

De esta manera, se pudieron obtener las secuencias mayoritarias en cada uno de los hidrolizados analizados. A continuación, las Tablas 9, 10 y 11 muestran los péptidos identificados en cada una de las muestras analizadas.

*Tabla 10 "Péptidos identificados en la hidrólisis de WPC enriquecido con  $\beta$ -lactoglobulina"*

N°	PÉPTIDO	SECUENCIA	MASA EXPERIMENTAL	MASA TEÓRICA	
<b>T= 20 min</b>					
1	$\beta$ -Lg	21-40	SLAMAASDISLLDAQSAPLR	2029.0	2029.1
2		149-162	LSFNPTQLEEQCHI	1658.6	1657.8
3		150-156	SFNPTQL	805.3	805.4
4		12-19	IQKVAGTW	901.5	901.5
<b>T= 120 min</b>					
5	$\beta$ -Lg	149-162	LSFNPTQLEEQCHI	1657.6	1657.8
6		123-130	VRTPEVDD	929.4	929.4
7		33-41	DAQSAPLRV	955.5	955.5
8		12-19	IQKVAGTW	901.5	901.5
9		83-89	KIDALNE	801.4	801.4
10		153-162	PTQLEEQCHI	1196.3	1196.5
11		90-97	NKVLVLDT	901.4	900.5
12		123-131	VRTPEVDDE	1058.4	1058.5
13	$\alpha$ -La	111-123	CSEKLDQWLCEKL	1593.9	1593.8

14		109-123	ALCSEKLDQWLCEKL	1777.9	1777.9
15		32-40	HTSGYDTQA	978.4	978.4

En los hidrolizados obtenidos a partir del WPC enriquecido en  $\beta$ -lactoglobulina se obtuvieron mayoritariamente péptidos derivados de esta proteína. A pesar de no haber detectado  $\alpha$ -lactoalbúmina en los geles de PAGE-SDS, se detectaron 3 péptidos derivados de esta proteína en el hidrolizado de 120 min. Aunque se esperaba conseguir péptidos de mayor peso molecular en los hidrolizados con tiempos más cortos, las diferencias en el peso molecular de los péptidos no fue muy notable, por lo que se tratará de obtener fracciones a partir de estos hidrolizados mediante técnicas de ultrafiltración con membranas de distinto tamaño de poro para obtener fracciones con péptidos de distinto tamaño molecular. El tratamiento de las muestras con un agente reductor previo al análisis nos permitió identificar péptidos conteniendo residuos de cisteína.

*Tabla 11 "Péptidos identificados en la hidrólisis de concentrado WPC con proteínas de suero de leche en proporciones naturales"*

N°	PÉPTIDO	SECUENCIA	MASA EXPERIMENTAL	MASA TEÓRICA	
<b>T= 20 min</b>					
1	$\beta$ -Lg	149-162	LSFNPTQLEEQCHI	1657.6	1657.8
2		76-92	TKIPAVFKIDALNENKV	1898.7	1899.1
3	$\alpha$ -La	104-117	WLAHKALCSEKLDQ	1641.6	1640.8
4		109-123	ALCSEKLDQWLCEKL	1777.8	1777.9
5		111-123	CSEKLDQWLCEKL	1594.0	1593.8
6		32-40	HTSGYDTQA	978.3	978.4

7		81-88	LDDDLTDD	920.3	920.4
8		109-117	ALCSEKLDQ	1005.5	1005.5
9		89-103	IMCVKKILDKVGINY	1736.1	1736.0
10		24-40	PEWVCTTFHTSGYDTQA	1942.3	1941.8
11		41-49	IVQNNDSTE	1018.6	1018.5
12		90-103	MCVKKILDKVGINY	1624.2	1622.9
13		19-35	GGVSLPEWVCTTFHTSG	1777.0	1776.8
<b>T= 120 min</b>					
14	$\beta$ -Lg	149-162	LSFNPTQLEEQCHI	1657.6	1657.8
15		24-31	PEWVCTTF	982.4	981.4
16		40-49	AIVQNNDSTE	1089.4	1089.5
17	$\alpha$ -La	32-40	HTSGYDTQA	978.4	978.4
18		41-49	IVQNNDSTE	1018.4	1018.5
19		1-9	EQLTKCEVF	1095.4	1095.5

En el caso de los hidrolizados obtenidos a partir del WPC tras 20 y 120 min de hidrólisis se obtienen principalmente péptidos procedentes de la  $\alpha$ -lactoalbúmina que, aunque se encuentra en menor proporción que la  $\beta$ -lactoglobulina en este producto, presenta mayor susceptibilidad a la acción de la pepsina.

Evidentemente, en el hidrolizado obtenido a partir del WPC enriquecido en  $\alpha$ -lactoalbúmina, la mayor parte de los péptidos identificados pertenecen a esta proteína. De hecho, sólo se identifica un péptido derivado de la  $\beta$ -lactoglobulina.

*Tabla 12 "Péptidos identificados en la hidrólisis de WPC enriquecido con  $\alpha$ -lactoalbúmina"*

N°	PÉPTIDO		SECUENCIA	MASA EXPERIMENTAL	MASA TEÓRICA
<b>T= 20 min</b>					
1	$\beta$ -Lg	3-20	VTQTMKGLDIQKVAGTWY	2038.3	2038.1
2	$\alpha$ -La	41-49	IVQNNDSTE	1018.4	1018.5
3		40-49	AIVQNNDSTE	1089.5	1089.5
4		81-88	LDDDLTDD	920.3	920.4
5		33-40	TSGYDTQA	841.3	841.3
6		41-50	IVQNNDSTEY	1181.5	1181.5
7		32-40	HTSGYDTQA	978.4	978.4
<b>T= 120 min</b>					
9	$\alpha$ -La	32-40	HTSGYDTQA	978.3	978.4
10		40-49	AIVQNNDSTE	1089.4	1089.5
11		10-17	RELKDLKG	957.6	957.6
12		32-39	HTSGYDTQ	907.3	907.4
13		41-49	IVQNNDSTE	1018.4	1018.5
14		10-18	RELKDLKGY	1120.5	1120.6
15		12-18	LKDLKGY	835.4	835.5



16		81-88	LDDDLTDD	920.3	920.4
17		97-103	DKVGINY	807.4	807.4
18		32-40	HTSGYDTQA	978.3	978.4
19		19-23	GGVSL	431.2	431.2
20		82-88	DDDLTDD	807.4	807.3

## VII.VI. APLICACIÓN DEL DIAGRAMA DE VENN

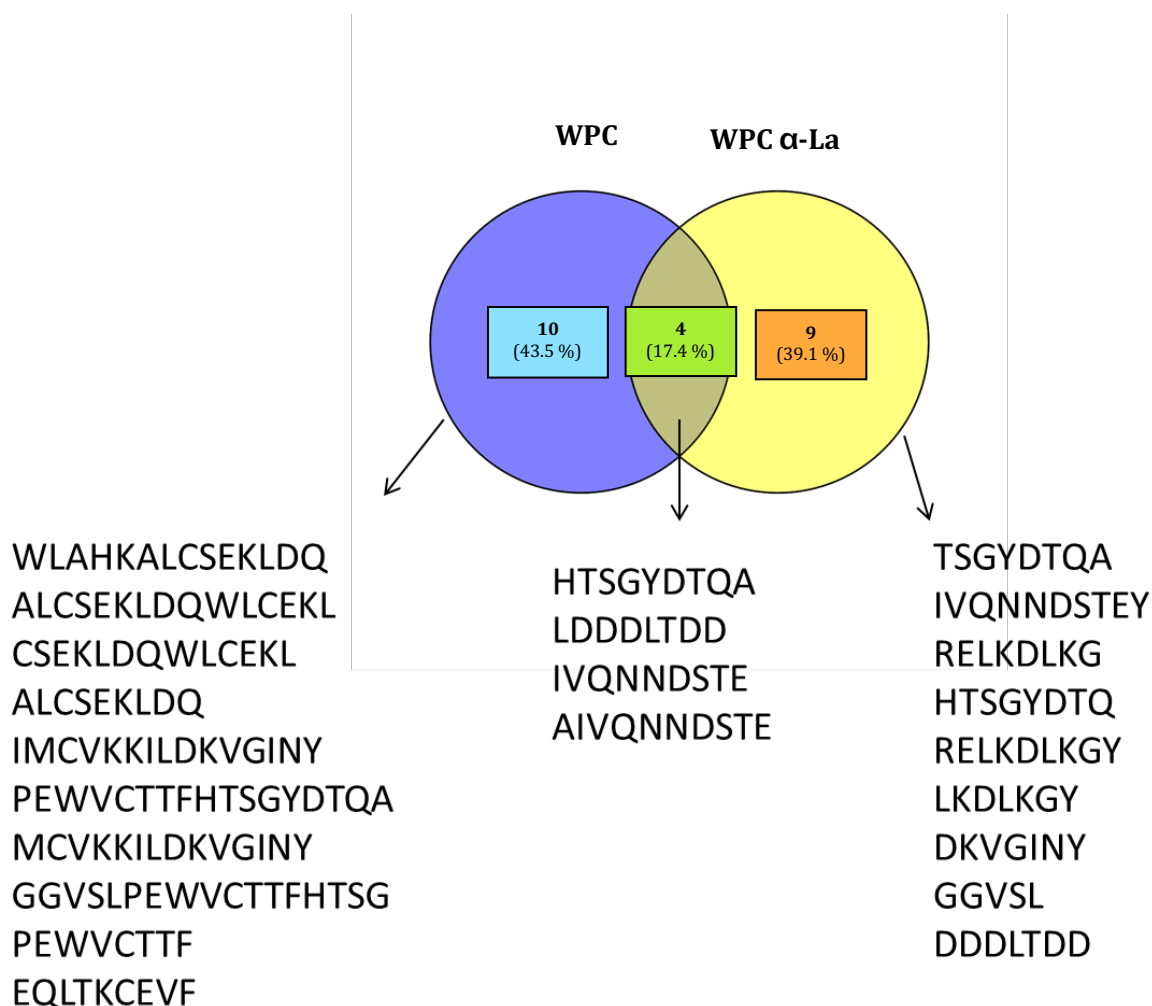


Figura 12 "Comparación mediante un diagrama de Venn de los péptidos comunes y no comunes derivados de la proteína  $\alpha$ -lactoalbúmina obtenidos en los hidrolizados de WPC y de WPC enriquecido en  $\alpha$ -lactoalbúmina."

De las Tablas anteriores, se observaba poca homología en las secuencias derivadas de  $\alpha$ -lactoalbúmina identificadas en los hidrolizados obtenidos con WPC y con WPC enriquecido en  $\alpha$ -lactoalbúmina. Se llevó a cabo un análisis comparativo con el programa Venny's on-line (Oliveros 2007) de estas secuencias. Curiosamente, se obtuvo que las secuencias de menor tamaño eran características del hidrolizado obtenido a partir del WPC enriquecido en  $\alpha$ -lactoalbúmina, mientras que las de mayor tamaño solo se encontraron en los hidrolizados del WPC que también contenía  $\beta$ -lactoglobulina. Solo se encontraron 4 péptidos comunes en ambos hidrolizados que correspondieron a péptidos con peso molecular intermedio. Esto parece indicar que la hidrólisis de la proteína  $\alpha$ -lactoalbúmina se ve influenciada por la presencia de  $\beta$ -lactoglobulina en el medio y que la concentración de esta última es suficiente para modificar el perfil peptídico obtenido tras la hidrólisis con pepsina.

#### VII.VII. COMPARACIÓN DE PÉPTIDOS DE LA $\beta$ -LACTOGLOBULINA Y $\alpha$ -LACTOALBÚMINA CON PÉPTIDOS PREVIAMENTE DESCRITOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Tabla 13 "Comparación de fragmentos con actividad biológica en bibliografía con fragmentos obtenidos"

ACTIVIDAD BIOLÓGICA	FRAGMENTO DE PÉPTIDO / SECUENCIA	FRAGMENTO DE PÉPTIDO ENCONTRADO	TEORÍA
Antihipertensivo	LQKW ( $\beta$ -Lg) LLF ( $\beta$ -Lg) $\beta$ -Lg (142- 145) $\beta$ -Lg (78- 80) Péptidos <3kDa	N.A	Calentando la $\beta$ -Lg durante los tratamientos enzimáticos de 60 a 80°C se favorece la formación de péptidos con actividad inhibidora de la ACE
Opioide	$\alpha$ (50- 53) $\beta$ -Lg (102- 105)	N.A	Los péptidos derivados del lactosuero realmente no tienen un efecto opioide como tal, sino que su interacción con receptores opioides tiene

				efecto vasodilatador, reduciendo así la presión arterial.
Antioxidante	0.1- 2.8 kDa		N.A	Fracciones más pequeñas necesitan ser analizadas para determinar la secuencia con actividad antioxidante
Antimicrobiano		$\alpha$ (12-18) / LKDLKGY	$\alpha$ (12-18) / LKDLKGY	La $\beta$ -Lactoglobulina y la $\alpha$ -Lactoalbúmina, generan péptidos con efecto antimicrobiano contra bacterias Gram-positivas.
Péptidos antitrombóticos		$\alpha$ (97-103)/ DKVGINY $\alpha$ (82-88)/ DDDLTTDD	$\alpha$ (97-103)/ DKVGINY $\alpha$ (82-88)/ DDDLTTDD	Péptidos antitrombóticos pueden inhibir la agregación plaquetaria debido a la analogía de su estructura con el fragmento 400-411 de la cadena g del fibrinógeno
Péptidos inmunomoduladores		$\alpha$ (19-23)/ GGVSL	$\alpha$ (19-23)/ GGVSL	Péptidos de cadena corta derivados del extremo N-terminal de la $\alpha$ -lactalbúmina bovina aumentan significativamente la proliferación de linfocitos sanguíneos periféricos humanos.

Al comparar los péptidos obtenidos, con los que la teoría hace referencia, se puede observar que con respecto a la  $\beta$ -lactoglobulina, no se ha encontrado ningún péptido bioactivo de los sugeridos por la bibliografía propuesta. De la misma manera, la teoría sugiere que la  $\beta$ -lactoglobulina sea digerida de 60 a 80°C para favorecer la formación de biopéptidos inhibidores de la ACE. Se recomienda realizar digestiones con pepsina a estas temperaturas mayores o a su vez, realizar ultrafiltraciones de los digeridos para obtener sólo los péptidos de bajo peso molecular. Con respecto a los péptidos opioides y antioxidantes ocurre algo similar, los fragmentos sugeridos por la bibliografía se refieren a péptidos de muy bajo peso molecular y de cadena muy corta, que al compararlos con los del perfil peptídico, no coincide con ninguno de los fragmentos obtenidos.

Se ha obtenido un fragmento con posibles propiedades antimicrobianas:  $\alpha$  (12-18); dos con posibles propiedades antitrombóticas,  $\alpha$  (97-103) y  $\alpha$  (82-88); y uno con posibles propiedades inmunomoduladoras  $\alpha$  (19-23). Estas propiedades aun necesitan ser reconfirmadas con pruebas posteriores, por ejemplo, prácticas de cultivo celular in vitro.

Además de estos fragmentos coincidentes con la bibliografía, se han determinado dos más, igualmente con cadena corta, pero originarios del concentrado de  $\beta$ -lactoglobulina:  $\beta$  (150- 156) y  $\beta$  (83- 89), de los que se recomienda también realizar análisis posteriores in vitro para confirmar su bioactividad o ausencia de ésta debido al énfasis encontrado en la bibliografía por péptidos de cadena corta y bajo peso molecular.

## VIII. CONCLUSIONES

- En hidrolizados enzimáticos de concentrados de proteínas de suero de leche con pepsina en condiciones que simulan la digestión gastrointestinal, se ha observado una mayor susceptibilidad de la  $\alpha$ -lactoalbúmina a la hidrólisis enzimática que para la  $\beta$ -lactoglobulina.

- Aunque se ha descrito que la  $\beta$ -lactoglobulina es resistente a la acción de la pepsina, los tratamientos a los que son sometidos los concentrados de proteínas de suero en su elaboración, son suficientes para aumentar la susceptibilidad de esta proteína a la acción de la pepsina.

- Se ha caracterizado el perfil peptídico de hidrolizados enzimáticos de distintos concentrados de proteínas de suero con distintas proporciones de  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina y se ha observado que la secuencia de los péptidos obtenidos a partir de  $\alpha$ -lactoalbúmina es distinta en función de la concentración de  $\beta$ -lactoglobulina en el medio de reacción.

- Todos los péptidos con posibles características funcionales se caracterizaron a un tiempo de 120 minutos de hidrólisis y son los de cadena más corta de todo el perfil peptídico obtenido de los concentrados de  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina. Comparando los datos con la teoría, se concluye que: el fragmento  $\alpha$  (12-18) presenta posibles características antimicrobianas; los fragmentos  $\alpha$  (97-103) y  $\alpha$  (82-88) características antitrombóticas y el fragmento  $\alpha$  (19-23) descrito como posible péptido inmunomodulador.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aleixandre, A., M. Miguel & B. Muguerza (2008) Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de leche y huevo. *Nutrición Hospitalaria*, 23, 313-318.
- Alvarado Carrasco, C. & M. Guerra (2010) Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 23, 45-50.
- Arroyo Castellon, Y., Y. Jiménez Farak & L. D. Guzmán Carrillo. 2013. Evaluación de rendimiento de la alfa lactoalbumina extraída del lacto suero dulce evaporado. Universidad de Cartagena.
- Banet, E. & F. Núñez (1992) La digestión de los alimentos: un plan de actuación en el aula fundamentado en una secuencia constructivista del aprendizaje. *Enseñanza de las Ciencias*, 10, 139-147.
- Benítez, R., A. Ibarz Ribas & J. Pagan i Gilabert (2008) Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clinica latinoamericana*, 2008, vol. 42, núm. 2, p. 227-236.
- Carrasco, C. A. & M. Guerra. 2010. Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. In *Anales Venezolanos de Nutrición*, 42-49.
- Coles, L. T., P. J. Moughan & A. J. Darragh In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 421-444.
- Cueva, C., A. Esteban-Fernández, I. Gil-Sánchez, M. Dueñas, P. J. Martín-Álvarez, M. Pozo-Bayón, B. Bartolomé & M. Moreno-Arribas (2015) Evaluación del metabolismo colónico de un vino tinto mediante el empleo de un nuevo modelo de simulación gastrointestinal dinámico (SIMGI).
- Guadix, A., E. Guadix, M. P. Dueñas, P. González-Tello & F. Camacho (2000) Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41, 79-89.
- Hirigoyen, M. D. J. (2014) Componentes de la leche.
- Huertas, P. (2009) Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 62, 4967-4982.
- Minekus, M., M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carriere, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. Mackie, S. Marze, D. J. McClements, O. Menard, I. Recio, C. N. Santos, R. P. Singh, G. E. Vegarud, M. S. J. Wickham, W. Weitschies & A. Brodkorb (2014) A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, 5, 1113-1124.
- Muñoz-González, I. (2014) Estudio del consumo moderado de vino sobre la función digestiva: metabolitos fenólicos y metaboloma fecal, microbiota oral y colónica, y respuesta inmune.
- Oliveros, J. C. (2007) VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams.
- Peram, M. R., S. M. Loveday, A. Ye & H. Singh (2013) In vitro gastric digestion of heat-induced aggregates of  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of dairy science*, 96, 63-74.
- Peso Echarri, P., C. A. González Bermúdez, M. I. Vasallo Morillas, M. Santaella Pascual, G. Ros Berrueto, C. Frontela Sasetta & C. Martínez Graciá (2012)  $\pm$ -Lactalbumina como ingrediente de fórmulas infantiles. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 62, 6-14.
- Poveda E, E. (2013) Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista chilena de nutrición*, 40, 397-403.
- Rodríguez-Hernández, G., A. L. Rentería-Monterrubio, J. C. Rodríguez-Figueroa & A. Chávez-Martínez (2014) Biopéptidos en la leche y sus derivados: funcionamiento y beneficios a la salud. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 1, 281-294.
- SANZ, R. P. Proteínas en nutrición artificial.
- Scientific, T. (2007) Pierce BCA Protein Assay Kit. *Rockford, IL*, 1-7.

- Segura-Campos, M., L. Chel-Guerrero & D. Betancur-Ancona (2010) EFECTO DE LA DIGESTIÓN EN LA BIODISPONIBILIDAD DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA. *Revista chilena de nutrición*, 37, 386-391.
- Spellman, D., E. McEvoy, G. O'cuinn & R. FitzGerald (2003) Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13, 447-453.
- Torres-Llenez, M. d. J., B. Vallejo-Cordoba & A. F. González-Córdova (2005) Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 55, 111-117.
- Yan, L., J. Chen, B. Xu, L. Guo, Y. Xie, J. Tang & J. Xie (2016) A liquid chromatography tandem mass spectrometric method on in vitro nerve agents poisoning characterization and reactivator efficacy evaluation by determination of specific peptide adducts in acetylcholinesterase. *Journal of Chromatography A*, 1450, 86-93.

## X. ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 "COMPOSICIÓN DE SUERO DE LECHE DULCE Y ÁCIDO" .....	8
TABLA 2 "CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES DEL SUERO DE LECHE (G/100G PROTEÍNA)" .....	8
TABLA 3 "CLASIFICACIÓN DE ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN LA DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS" .....	11
TABLA 4 "PREPARACIÓN DE LOS FLUIDOS DE DIGESTIÓN DE SOLUCIÓN STOCK DE ELECTROLITOS A 1.25X DE CONCENTRACIÓN" .....	14
TABLA 5 "CONDICIONES ÓPTIMAS DE ALGUNAS PROTEASAS DE IMPORTANCIA EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA" .....	15
TABLA 6 "VOLÚMENES DE TRABAJO FINAL DE LOS FLUIDOS SIMULADOS DE DIGESTIÓN" .....	27
TABLA 7 "AJUSTE DE PH E INACTIVACIÓN DE PEPSINA DURANTE LA HIDRÓLISIS DE LAS MUESTRAS DE CONCENTRADO WPC ENRIQUECIDO EN B-LACTOGLOBULINA" .....	34
TABLA 8 "AJUSTE DE PH E INACTIVACIÓN DE PEPSINA DURANTE LA HIDRÓLISIS DE LAS MUESTRAS DE CONCENTRADO WPC ENRIQUECIDO CON B-LG Y A-LA" .....	35
TABLA 9 "AJUSTE DE PH E INACTIVACIÓN DE PEPSINA DURANTE LA HIDRÓLISIS DE LAS MUESTRAS DE CONCENTRADO WPC ENRIQUECIDO EN A-LACTOALBÚMINA" .....	36
TABLA 10 "PÉPTIDOS IDENTIFICADOS EN LA HIDRÓLISIS DE WPC ENRIQUECIDO CON B-LACTOGLOBULINA" .....	45
TABLA 11 "PÉPTIDOS IDENTIFICADOS EN LA HIDRÓLISIS DE CONCENTRADO WPC CON PROTEÍNAS DE SUERO DE LECHE EN PROPORCIONES NATURALES" .....	46
TABLA 12 "PÉPTIDOS IDENTIFICADOS EN LA HIDRÓLISIS DE WPC ENRIQUECIDO CON A-LACTOALBÚMINA" .....	48
TABLA 13 "COMPARACIÓN DE FRAGMENTOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN BIBLIOGRAFÍA CON FRAGMENTOS OBTENIDOS" .....	50



## XI. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 "ESQUEMA RESUMIDO DE LA DIGESTIÓN HUMANA Y SUS PROTEASAS IMPLICADAS" .....	12
FIGURA 2 "ESTACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN PH STAT TITRALAB 854 DE RADIOMETER ANALYTICAL (UNA MARCA DE LA COMPAÑÍA HACH)" .....	17
FIGURA 3 "PH- STAT ACOPLADO A UN BAÑO TERMOSTÁTICO Y AGITADOR MAGNÉTICO" .....	17
FIGURA 5 " SIMULADOR DINÁMICO DEL TRACTO GASTROINTESTINAL SIMGI. A) ESTÓMAGO; B Y C) CAJAS CONTROLADORAS; D) INTESTINO DELGADO; E, F Y G) COLON ASCENDENTE, TRANSVERSO Y DESCENDENTE, RESPECTIVAMENTE; H) BOMBAS" .....	18
FIGURA 7 "ESQUEMA DE DIGESTIÓN IN VITRO PARA CONCENTRADOS DE PROTEÍNAS DE SUERO DE LECHE (WPC)" .....	28
FIGURA 8"PERFIL ELECTROFORÉTICO DEL CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE WPC ENRIQUECIDO CON B-LACTOGLOBULINA" .....	37
FIGURA 9"PERFIL ELECTROFORÉTICO DEL CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE WPC CON PROTEÍNAS DE SUERO DE LECHE EN SUS PROPORCIONES NATURALES" .....	38
FIGURA 10 "PERFIL ELECTROFORÉTICO DEL CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE WPC ENRIQUECIDO CON A-LACTOALBÚMINA" .....	39
FIGURA 11 "DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS A PARTIR DE LOS CONCENTRADOS DE PROTEÍNA DE SUERO: A) WPC ENRIQUECIDO EN B-LACTOGLOBULINA; B) WPC SIN ENRIQUECER Y C) WPC ENRIQUECIDO CON $\beta$ -LACTOALBÚMINA" .....	40
FIGURA 12"DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN LOS SOBRENADANTES OBTENIDOS DE LA HIDRÓLISIS A PARTIR DE LOS CONCENTRADOS DE PROTEÍNAS DE SUERO: A) WPC ENRIQUECIDO EN B-LACTOGLOBULINA; B) WPC SIN ENRIQUECER; Y WPC ENRIQUECIDO EN A-LACTOALBÚMINA" .....	42
FIGURA 13 "DATOS OBTENIDOS MEDIANTE HPLC-MS/MS A) CORRIENTE TOTAL DE IONES DEL CONCENTRADO WPC ENRIQUECIDO EN A-LACTOALBÚMINA HIDROLIZADO DURANTE T=120 MINUTOS. B) CROMATOGRAMA UV A 214 NM DEL MISMO HIDROLIZADO. C) ESPECTRO DE MS/ MS DEL IÓN M/z 979,5, QUE ELUYE A 23 MIN, CORRESPONDIENTE AL PÉPTIDO DE SECUENCIA HTSGYDTQA" .....	44
FIGURA 14 "COMPARACIÓN MEDIANTE UN DIAGRAMA DE VENN DE LOS PÉPTIDOS COMUNES Y NO COMUNES DERIVADOS DE LA PROTEÍNA A-LACTOALBÚMINA OBTENIDOS EN LOS HIDROLIZADOS DE WPC Y DE WPC ENRIQUECIDO EN A-LACTOALBÚMINA." .....	49